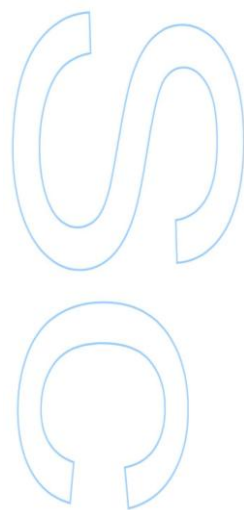


# Efeitos tóxicos de biocidas (hipoclorito de sódio e bronopol) no crustáceo cladóceros *Daphnia* *magna*



**Joana Ganso Martins**

Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água  
Biologia  
2013

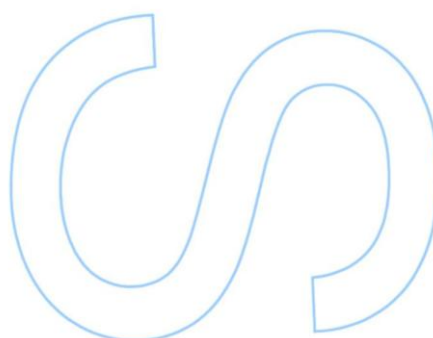
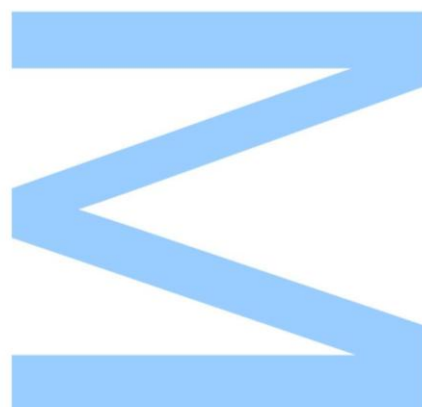
## **Orientador**

Professora Doutora Lúcia Guilhermino,  
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar  
da Universidade do Porto, Departamento de Estudos de Populações,  
Laboratório de Ecotoxicologia & Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e  
Ambiental, Laboratório de Ecotoxicologia e Ecologia



Todas as correções determinadas  
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.  
O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



"Na Natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma"

*Lavoisier*

# Agradecimentos

Gostaria de agradecer a realização desta Tese de Mestrado à minha Orientadora Doutora Lúcia Guilhermino por toda a sua paciência e ajuda fundamental na realização deste projeto final de Mestrado.

Gostaria também de agradecer à Mestre Alexandra Martins que me guiou ao longo da tese e me ensinou toda a prática que se requer na cultura de *Daphnia magna*, assim como nos ensaios toxicológicos, a sua ajuda foi determinante para um bom desempenho prático e um muito obrigado a todos os meus colegas de laboratório, Cristiana, Andreia, Patrícia, Sónia e Daniel que também contribuíram para o desenvolvimento deste projecto.

Um enorme obrigado à minha família e meus amigos por ouvirem os meus desabafos e pela força me dada ao longo deste ano e por me fazerem continuar no momento mais negro da minha vida e me fazerem rir nos momentos mais complicados.

Um especial obrigado à minha adorada Mãe que sempre me motivou para chegar onde cheguei, sendo que esta Dissertação é dedicada a ti!

“Para conhecermos os amigos é necessário passar pelo sucesso e pela desgraça. No sucesso, verificamos a quantidade e, na desgraça, a qualidade”

*Confúcio*

O trabalho de investigação conducente à presente Tese foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia e por fundos FEDER através do Projecto Estratégico – LA 15 – 2013-2014 (PEst-C/MAR/LA0015/2013) e por verbas do Laboratório de Ecotoxicologia do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

# Resumo

Os biocidas são considerados como contaminantes ambientais emergentes de grande preocupação ambiental. Neste contexto, o grupo de biocidas são geralmente designados por desinfetantes que são especialmente importantes pois são amplamente utilizados em Medicina (humana e veterinária), em várias indústrias e em atividades domésticas. O principal objetivo do presente trabalho é avaliar os efeitos tóxicos de dois desinfetantes, o hipoclorito de sódio (S-HIP) e o bronopol (BNP) em crustáceos cladóceros *Daphnia magna*, um dos modelos biológicos mais utilizados em Ecotoxicologia, especialmente para avaliar os efeitos tóxicos de contaminantes ambientais nos consumidores primários de água doce. O bronopol é o ponto de partida deste estudo, uma vez que este é uma substância instável devido ao seu elevado nível de degradação apenas os produtos resultantes desta substância pode ser utilizados no estudo. O bromonitroetanol é um dos produtos de degradação produzidos em maiores quantidades e permanece por um tempo mais longo, por isso acaba por ser a substância escolhida para avaliar a toxicidade do bronopol no ambiente. Numa primeira fase do estudo, as metodologias para a cultura de *Daphnia magna* no laboratório, incluindo a manutenção de *Chlorella vulgaris* como fonte de alimento para as dafnias, e os procedimentos para a realização de bioensaios agudo e crónico com *D. magna* foram aprendidas e treinadas. Numa segunda fase, a metodologia aplicada para se determinar as concentrações de exposição das substâncias de teste e o seu potencial de degradação no meio de teste durante os bioensaios foi por espectrofotometria adaptando-se às condições experimentais utilizadas e optimizadas para uma das substâncias de teste. Em seguida, numa terceira fase, os bioensaios independentes agudos com S -HIP e bronopol foram realizados utilizando a mortalidade como critério. Finalmente, os bioensaios de 21 dias para avaliar a toxicidade crónica para *D.magna* foram realizadas, utilizando-se como critério a reprodução. A partir dos resultados dos bioensaios agudos, as curvas de toxicidade foram obtidas através da representação gráfica da transformação das concentrações de exposição em log versus a transformação do probit em percentagens de mortalidade. A partir destas curvas, a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) e a concentração que provoca 20% de mortalidade (CL<sub>20</sub>) na população estudada sob as condições experimentais utilizadas foram calculadas. Os dados do bioensaio crónico foram analisados por análise unidirecional de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnett quando foram encontradas diferenças significativas. Os bioensaios agudos foram estendidos até às 96h porque nenhuma mortalidade foi observada após 24 e 48h de exposição à substância a testar . A degradação do S -HIP foi muito rápida porque o composto é muito volátil e as concentrações utilizadas foram muito baixas. Após as 96h de exposição, o CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub> do S -HIP em *D. magna* foram 0,047 mg L<sup>-1</sup> e 0,055 mg L<sup>-1</sup>, respetivamente. O bronopol degradou-se muito rapidamente no meio do ensaio, por

isso, a toxicidade aguda e crônica avaliada corresponde aos efeitos gerais induzidos por todos os produtos de degradação formados, entre eles o bromonitroetanol (BNE) em vez do composto parental. Após 96h de exposição, o CL<sub>20</sub> e o CL<sub>50</sub> do BNP para *D. magna* foram 0,177 mg L<sup>-1</sup> e 0,252 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. O bronopol e/ou os seus produtos de degradação causaram uma redução significativa de juvenis viáveis em concentrações iguais ou superiores a 0,004 mg L<sup>-1</sup>, com uma diminuição significativa de juvenis viáveis e a indução de ovos abortados. No geral, os resultados do presente estudo indicam que a exposição a curto prazo de S- HIP ou BNP (e/ou seus produtos de degradação) em concentrações baixas na ordem dos ppm causa mortalidade em *D. magna*, enquanto que a exposição crônica para o bronopol (e/ou seus produtos de degradação) em concentrações baixas na ordem dos ppm prejudica a reprodução de *D. magna*. Encontramos também ovos abortados e juvenis viáveis, mas não havia juvenis mortos. Através da análise de variância (ANOVA), houve diferenças significativas nos juvenis vivos (P<0,05) e nos ovos abortados (P<0,05). O valor de CENO de juvenis viáveis é de 0,004 mg L<sup>-1</sup>, sendo a menor concentração usada no ensaio, não sendo possível obter o valor de CEO. O valor de CENO de ovos abortados é de 0,004 mg L<sup>-1</sup>, não sendo possível obter o valor de CEO. Concluiu-se que os biocidas utilizados com bastante frequência na desinfecção e conservação têm efeitos letais e sub-letais em *Daphnia magna* e efeitos na reprodução levando a uma diminuição na produção de juvenis e aumento da produção de ovos abortados, mesmo na concentração mais baixa. Por isso, em situações reais, as populações selvagens de *D. magna* e outros consumidores primários podem ser reduzidos por exposição a curto prazo a altas concentrações destas substâncias e/ou exposição a longo prazo a concentrações mais baixas de bronopol/produtos de degradação. Em sistemas aquáticos, a redução das populações de consumidores primários podem levar ao desenvolvimento excessivo da comunidade fitoplanctônica, em última análise, causando condições eutróficas, levando à redução das populações de consumidores secundários, devido à falta de alimento, resultando em efeitos potenciais adversos sobre o funcionamento do ecossistema.

**Palavras chave:** *Daphnia magna*, hipoclorito de sódio, bronopol, bromonitroetanol, toxicidade

# Abstract

Biocides are considered emerging environmental contaminants of high environmental concern. In this context, the group of biocides commonly designed by disinfectants are specially important because they are widely used in Medicine (human and veterinary), in several industries and in domestic activities. Therefore, the main goal of the present Thesis is to assess the toxic effects of two widely used disinfectants, sodium hypochlorite (S-HIP) and bronopol (BNP) in crustacean cladoceran *Daphnia magna*, one of the most used biological models in Ecotoxicology, especially to assess the toxic effects of environmental contaminants to freshwater primary consumers. Bronopol is the starting point of this study, once this is a instable substance due to his high level of degradation, only the products resultant from this substance can be used in a study. Bromonitroethanol is one of the degradation products produced in larger quantities and remains for a longer time so is the substance chosen to evaluate the toxicity of the substance in the environment. In a first phase of the study, the methodologies to culture *Daphnia magna* in the laboratory, including the maintenance of *Chlorella vulgaris* as a food source for daphnids, and the procedures to carry out acute and chronic bioassays with *D. magna*, were learned and training. In the second phase, the methodology to determine the exposure concentrations of the test substances and their potential degradation in the test medium during the bioassays by spectrophotometry was adapted to the experimental conditions used and optimized for one of the test substances. Then, in a third phase, acute independent bioassays with S-HIP and bronopol were carried out using mortality as effect criterion. Finally, 21-day bioassays to assess the chronic toxicity of to *D. magna* were carried out, using reproduction as effect criterion. From the acute bioassays results, the toxicity curves were obtained by plotting the log transformed exposure concentrations *versus* the probit transformed percentages of mortality. From these curves, the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) and the concentration causing 20% of mortality (LC<sub>20</sub>) in the studied population under the experimental conditions used were calculated. Data from the chronic bioassay were analysed by one-way Analysis of Variance (ANOVA), followed by the Dunnett's test when significant differences were found. Acute bioassays were extended until 96h because no significant mortality was observed after 24 and 48 h of exposure to the test substances. The degradation of S-HIP was very quickly because the coumpound is very volatile and the concentrations used were very low, after 96h of exposure, the LC<sub>20</sub> and LC<sub>50</sub> of S-HIP to *D. magna* were 0,047 mg L<sup>-1</sup> and 0,055 mg L<sup>-1</sup>, respectively. Bronopol was found to degradate very rapidly in test media. Therefore the acute and chronic toxic toxicity evaluated correspond to the overall effects induced by all the degradation products formed within bromonitroethanol (BNE) rather than by the parental compound. After 96h of exposure, the LC<sub>20</sub> and LC<sub>50</sub> of BNP to *D. magna* were 0,177 mg L<sup>-1</sup> and 0,252 mg L<sup>-1</sup>,



respectively. Bronopol and/or its degradation products caused a significant reduction of *D. magna* reproductive output at concentrations equal or higher than 0,004 mg L<sup>-1</sup>, with a significant decrease of live juveniles and the induction of aborted eggs. Overall, the results of the present study indicate that short-term exposure to concentrations of S-HIP or BNP (and/or its degradation products) in the low ppm range cause mortality in *D. magna*, while chronic exposure to concentrations to broponol (and/or its degradation products) in the low ppm range impair *D. magna* reproduction. We also found alive and juvenile aborted eggs, but there were no dead juveniles. Through analysis of variance (ANOVA), were found significant differences in both, the live juveniles ( $P < 0,05$ ) and in the eggs aborted ( $P < 0,05$ ). The NOEC of juveniles living is 0,004 mg L<sup>-1</sup> which is the lowest concentration however wasn't found the CEO value. The NOEC of aborted eggs is 0,004 mg L<sup>-1</sup>, however wasn't found the CEO value. It is concluded that the biocides used quite frequently on disinfection and preservation have a lethal and sublethal effects on *Daphnia magna*, and effects on reproduction which leads to a decrease in production of juvenile and increase of aborted eggs production even in the lowest concentration. Therefore, in real scenarios, wild populations of *D. magna* and other primary consumers may be reduced by short-term exposure to high concentrations of these substances and/or long-term exposure to lower concentrations of bronopol/degradation products. In aquatic systems, the reduction of primary consumers populations may lead to overdevelopment of the phytoplankton community ultimately causing eutrophic conditions, and to the reduction of secondary consumers populations due to food shortness, with potential adverse effects on ecosystem functioning.

**Keywords:** *Daphnia magna*, sodium hypochlorite, bronopol, bromonitroethanol, toxicity

# Índice

1. Introdução.....	17
1.1. Legislação .....	2
1.2. Biocidas .....	3
1.2.1. Bronopol .....	4
1.2.2. Hipoclorito de sódio .....	6
1.3. <i>Daphnia magna</i> como organismo de estudo .....	8
1.3.1. Reprodução em <i>Daphnia magna</i> .....	10
2. Objetivos.....	12
3. Material e Métodos .....	12
3.1. Organismo teste.....	13
3.2. Culturas de <i>Daphnia magna</i> .....	13
3.3. Cultura de <i>Chorella vulgaris</i> e preparação de alimento para <i>D. magna</i> .....	14
3.2. Avaliação da adequabilidade das culturas parentais para uso em ensaios ecotoxicológicos	16
3.3. Optimização das condições para determinação da concentração das substâncias-teste por espectrofotometria durante os bioensaios.....	17
3.4. Bioensaio com lixívia comercial .....	18
3.5. Bioensaio com bronopol e seus produtos de degradação.....	19
4. Resultados e Discussão .....	20
4.1. Estado das culturas parentais de <i>Daphnia magna</i> .....	20
4.2. Espectros de absorção, curvas de calibração e degradação do hipoclorito de sódio .....	21
4.3. Espectros de absorção, curvas de calibração e degradação do bromonitroetanol por degradação do bronopol .....	28
4.4. Ensaio agudo com solução comercial de hipoclorito de sódio.....	32
4.5. Ensaio agudo com bronopol.....	34
4.6. Ensaio crónico com bronopol.....	37
5. Conclusões e futuros estudos.....	40
6. Referências bibliográficas .....	42

# Lista de Tabelas

Tabela 1. CE <sub>50</sub> , CL <sub>50</sub> , CEO e CENO de S-HIP (Shan-Shin <i>et al.</i> , 2012; Emmanuel <i>et al.</i> , 2004; Manning <i>et al.</i> , 1996; Mattei <i>et al.</i> , 2006) e de BNP (USEPA, 2009) em <i>Daphnia magna</i> e <i>Americamysis bahia</i> .....	4
Tabela 2. Valores de CE <sub>50</sub> , CL <sub>50</sub> , CEO e CENO do S-HIP em <i>Ceriodaphnia magna</i> (Manning <i>et al.</i> , 2006) e em <i>Daphnia magna</i> (USEPA, 1984; Mattei <i>et al.</i> , 2006).....	8
Tabela 3. Concentrações nominais de hipoclorito de sódio em água u.p e correspondentes absorvências medidas a 292nm. Os valores são a absorvência a 292 nm de cada uma de três réplicas (soluções preparadas de forma independente), e os correspondentes valores da média e erro padrão da média (EPM) .....	25
Tabela 4. Concentrações nominais de hipoclorito de sódio em ASTM e correspondentes absorvências medidas a 292nm. Os valores são a absorvência a 292 nm de cada uma de três réplicas (soluções preparadas de forma independente), e os correspondentes valores da média e erro padrão da média (EPM) .....	26
Tabela 5. Concentração nominal de 4 mg L <sup>-1</sup> em água u.p correspondentes às absorvências medidas a 244nm. Os valores são a absorvência a 244 nm de cada uma de três réplicas (soluções preparadas de forma independente), e os correspondentes valores da média e erro padrão da média (EPM) às 96 horas .....	29
Tabela 6. Concentração nominal de 4 mg L <sup>-1</sup> em ASTM correspondentes às absorvências medidas a 244nm. Os valores são a absorvência a 244 nm de cada uma de três réplicas (soluções preparadas de forma independente), e os correspondentes valores da média e erro padrão da média (EPM) às 96 horas .....	29
Tabela 7. Formação (F%) de bromonitroetanol através da degradação de bronopol às 3,6,9,12,24, 48 e 96h com a concentração de 4mg L <sup>-1</sup> através do método de espectrofotometria. A média (3 réplicas) representa o pico máximo do BNE obtido a 244nm, em Densidade ótica (DO). DP indica o desvio-padrão da média e (*) indica as médias que são estatisticamente diferentes das 0 horas.....	31
Tabela 8. Valores da concentração letal mediana (CL <sub>50</sub> ) de hipoclorito para <i>Daphnia magna</i> determinados com base na mortalidade registada às 24, 48, 72 e 96h, com os correspondentes intervalos de confiança a 95% (IC95%) .....	33

Tabela 9. Formação (F%) de bromonitroetanol através da degradação de bronopol às 24, 48 e 96h com as concentrações de 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 mg L<sup>-1</sup> através do método de espectrofotometria. A média (3 réplicas) representa o pico máximo de BNE obtido a 244nm, em Densidade ótica (DO). DP indica o desvio-padrão da média e (\*) indica diferenças estatisticamente diferentes do controlo (p<0,05).....36

Tabela 10. Parâmetros de toxicidade durante 96h face à exposição do bronopol (BNP) em *Daphnia magna* .....37

Tabela 11. Formação (F%) de bromonitroetanol (BNE) às 24, 48, 72 e 96h através do método de espectrofotometria em ASTM. A média (4 réplicas) representa o pico máximo do BNE obtido a 244nm, em Densidade ótica (DO). DP indica o desvio-padrão da média e (\*) indica diferenças estatisticamente diferentes do controlo (p<0,05).....39

# Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química do Bronopol (adaptado de Sigma-Aldrich) .....	5
Figura 2. Estrutura química do hipoclorito de sódio.....	6
Figura 3. Formação do ácido hipocloroso aquando a utilização do S-HIP como fonte de cloro .....	6
Figura 4. Dissociação do ácido hipocloroso.....	7
Figura 5. Reação de adição do HClO .....	7
Figura 6. Reação de substituição do HClO .....	7
Figura 7. Reação de oxidação do HClO .....	7
Figura 8. Formação de compostos halogenados (clorofórmio).....	7
Figura 9. <i>Daphnia magna</i> com ovos .....	9
Figura 10. Macho (1) e fêmea (2). O macho possui uma segunda antena maior que a fêmea (seta), não tem câmara de ovos (círculo) e possui uma pequena protuberância (*) .....	11
Figura 11. Culturas parentais individuais de <i>Daphnia magna</i> , mantidas em laboratório a 20±1°C	14
Figura 12. Cultura de <i>Chlorella vulgaris</i> , em que 1 é o tubo de arejamento, 2 é o tubo de saída de ar e 3 é o tubo de troca de meio.....	15
Figura 13. Vista parcial do ensaio de toxicidade realizado expondo <i>Daphnia magna</i> ao dicromato de potássio.....	17
Figura 14. Espectros de absorção (de 200 a 900 nm) de uma solução de lixívia comercial diluída em água u.p. com uma concentração de 1400 mg L <sup>-1</sup> (a1) e com uma concentração de 5,47 mg L <sup>-1</sup> (a2) .....	22

Figura 15. Espectros de absorção (de 200 a 900 nm) de uma solução de lixívia comercial diluída em ASTM com uma concentração de $1400 \text{ mg L}^{-1}$ (b1) e com uma concentração de $5,47 \text{ mg L}^{-1}$ (b2) .....	23
Figura 16. Reta de calibração do S-HIP em ASTM.....	24
Figura 17. Reta de calibração do S-HIP em água ultra pura .....	24
Figura 18. Espectros de absorção (de 200 a 900 nm) do bronopol em água u.p com uma concentração de $4 \text{ mg L}^{-1}$ (a1) e em ASTM com uma concentração de $4 \text{ mg L}^{-1}$ (a2) .....	29
Figura 19.Reta de calibração do BNP em ASTM .....	30
Figura 20. Reta de calibração do BNP em água ultra pura.....	31

# Lista de Gráficos

Gráfico 1. Média de juvenis de uma cultura de <i>Daphnia magna</i> por ninhada .....	21
Gráfico 2. Formação de bromonitroetanol em água ultra pura e ASTM através da degradação de bronopol, em função da absorvência com uma concentração de 4mg L <sup>-1</sup> durante 96 horas..	32
Gráfico 3. Mortalidade (%) de <i>Daphnia magna</i> face à exposição de hipoclorito de Sódio durante 96horas .....	34
Gráfico 4. Mortalidade (%) de <i>Daphnia magna</i> exposta ao bromonitroetanol por degradação do bronopol durante 96 horas.....	35
Gráfico 5. Formação de bromonitroetanol através da degradação de bronopol, em função da absorvância a 244nm durante 96 horas .....	37
Gráfico 6. Número de juvenis vivos e número de ovos abortados de <i>Daphnia magna</i> durante 21 dias com as correspondentes barras do erro padrão da média. (*) indica diferenças estatisticamente diferentes (p<0,005, Dunnett's test) relativamente ao controlo .....	38
Gráfico 7. Formação de Bromonitroetanol através da degradação de Bronopol, em função da absorvência durante 21 dias.....	40

# Abreviaturas

A. nodosum – *Ascophyllum nodosum*

ASTM – American society for testing and material

ATA – Ácido tricloroacético

BNE – 2-bromo-2-nitroetanol

BNM - bromonitrometano

BNP – Bronopol

CAQ – Compostos de amónia quaternários

*C.vulgaris* – *Chlorella vulgaris*

CENO – Concentração de efeito não observado

CEO – Concentração de efeito observado

CE<sub>50</sub> – Concentração efeito para 50% dos organismos

CL<sub>50</sub> – Concentração letal para 50% dos organismos

CLO<sub>2</sub> – Dióxido de cloro

DCA – Ácido dicloroacético

*D. magna* – *Daphnia magna*

EPA – Environmental protection agency

ETA's – Estações de tratamento de águas

ETAR's – Estações de tratamento de águas residuais

GADPHE – Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

S-HIP – hipoclorito de sódio

PAA – Ácido peracético

RPM – Rotação por minuto

U.P – Ultra-pura

USEPA - United States Environmental Protection Agencia



# 1. Introdução

A água é um bem essencial a todos os seres vivos, e como tal, a sua qualidade e quantidade é de elevada importância para assegurar a sobrevivência dos organismos e a manutenção de toda a Biosfera. Desta forma, a qualidade e a quantidade de água potável e não potável tem sido uma preocupação a nível mundial (UNESCO, 2009), pois a contaminação dos ecossistemas marinhos e doces são cada vez mais frequentes, não só devido ao crescimento populacional, industrial e agrícola (Gasser *et al.*, 2007), mas também pela falta de infra-estruturas que assegurem o tratamento de efluentes das estações de tratamento de águas residuais (ETAR's). O aquecimento global (retenção das radiações na estratosfera) é também uma das preocupações a nível mundial, pois a temperatura da água aumenta (Huntington, 2006) e as chuvas ácidas levam à diminuição do pH da água, impossibilitando a existência de algumas espécies que são a base da manutenção dos ecossistemas (recifes de coral). Desta forma, os organismos terrestres e aquáticos acabam por estar expostos a fatores naturais que provocam o stress dos mesmos (pH, temperatura, nutrientes...) e a fatores antropogénicos (químicos, metais, pesticidas...).

As descargas de efluentes lançadas para o ambiente acidentalmente ou não, têm sempre um risco ecológico elevado (Richardson e Bowron, 1985). Os processos químicos e físico-químicos de indústrias, por exemplo, são também responsáveis pela emissão de substâncias tóxicas no ambiente, existindo uma variedade de compostos que muitas das vezes quando descarregados nos rios e mares combinam-se com outros compostos, desde nutrientes a químicos. Com a agricultura, uma atividade muito exercida em Portugal, pode ainda ocorrer a infiltração dos tóxicos nos solos, levando à contaminação de poços e/ou de aquíferos (Tabor e Barber, 1996) afetando as águas de consumo (CCPCT, 2000). Deste modo, a indústria e a agricultura acabam por se tornar nas atividades que mais efluentes tóxicos produzem, uma das agravantes deste fato é que os efluentes por vezes, são descarregados diretamente nos rios e mares sem qualquer tratamento prévio. As misturas de produtos tóxicos através de processos químicos e/ou biológicos pode levar à formação de sub-produtos que por sua vez podem ser ainda mais tóxicos e persistentes que os iniciais (Holtze *et al.*, 2008; Salinoja-Salonen e Jokela, 1991), causando graves problemas ambientais.

Entre os diversos tóxicos presentes no ambiente, encontram-se os pesticidas agrícolas e não agrícolas, compostos frequentemente utilizados por quase todas as atividades industriais e não-industriais devido às suas inúmeras aplicações, entre elas a eliminação de microrganismos prejudiciais. Os biocidas inseridos nos pesticidas não agrícolas são considerados contaminantes emergentes, e por isso, de grande preocupação ambiental. Os produtos biocidas estão

caracterizados como substâncias ativas, sendo apresentadas ao consumidor na forma exata em que são vendidas, tendo como finalidade a destruição, o impedimento do crescimento e o controlo de um organismo prejudicial (Diretiva 98/8/CE). O bronopol (BNP) e o hipoclorito de sódio (S-HIP) são dos biocidas mais utilizados em diferentes áreas (indústria, indústria alimentar, hospitais, habitações, ETARs, estábulos, canis...); o bronopol é usado como conservante em inúmeros produtos comerciais (shampôs, cosméticos, produtos alimentares...) e o hipoclorito de sódio é usado como um desinfetante para a desinfecção de diversas áreas (hospitais, canis, estábulos, ETAs...). Os biocidas, pertencentes aos pesticidas não agrícolas encontram-se divididos em 4 grupos principais (Diretiva 98/8/CE): desinfetantes e produtos gerais biocidas, conservantes, controlo de pragas e outros produtos de biocidas. O uso constante e indiscriminado de pesticidas assim como a presença de pequenas quantidades de tóxicos (trihalometanos, compostos orgânicos halogenados adsorvíveis...) poderá provocar um impacto negativo em todas as comunidades dos ecossistemas, e por conseguinte na cadeia trófica. Contudo, os poluentes por vezes não afetam diretamente os organismos mas acabam por afetar indiretamente através do alimento, ou seja, podem existir poluentes que possam prejudicar a comunidade fitoplantónica, impedindo o crescimento do fitoplâncton. O crustáceo cladóceros *Daphnia magna*, organismo filtrador e considerado um bio-indicador da qualidade da água encontra-se no início da cadeia trófica, pertencendo aos consumidores primários, e por isso essencial ao bom funcionamento de todo o ecossistema e de toda a cadeia alimentar.

Por isso, é necessário e urgente proteger os recursos hídricos, um bem essencial a todos os seres vivos, entre eles o Homem (Rodriguez Mozaz *et al.*, 2006). Assim, ao longo deste estudo, pretende-se verificar qual ou quais os efeitos letais e sub-letais face à exposição dos biocidas, bronopol e hipoclorito de sódio em *Daphnia magna*.

## 1.1.Legislação

Em todos os ensaios toxicológicos determina-se os efeitos letais e/ou sub-letais, e para tal, são calculadas as concentrações que provocam um efeito ou a morte em 50% dos organismos a serem testados ( $CE_{50}$  e  $CL_{50}$ , respetivamente), e, como tal, a Diretiva-UE 93/67/EEC (Comissão da Comunidade Europeia, 1996) estabeleceu limites para os valores de  $CE_{50}$ , formando 3 classes: (I)  $CE_{50} < 1 \text{ mg L}^{-1}$ , muito tóxico para os organismos aquáticos; (II)  $CE_{50} = 1-10 \text{ mg L}^{-1}$ , tóxico para organismos aquáticos e (III)  $CE_{50} = 10-100 \text{ mg L}^{-1}$ , perigoso para os organismos aquáticos.

Segundo os dados da USEPA (2012) o total de cloro residual presente na água para descarga não deve exceder os  $631 \text{ } \mu\text{g/L/dia}$  e não deve exceder os  $456 \text{ } \mu\text{g/L/mês}$ . Em Portugal,

segundo o Decreto-Lei 236/1998 o valor limite de emissão para o cloro livre é de 0,5 mg L<sup>-1</sup> Cl<sub>2</sub> e para o cloro residual é de 1,0 mg L<sup>-1</sup> Cl<sub>2</sub>.

Quanto ao bronopol, o Regulamento (CE) n.º 528/2012 estabelece condições de autorização de produtos biocidas para serem lançadas no mercado: “as substâncias ativas estão aprovadas para o tipo de produto em causa; quando utilizado de acordo com a autorização, o produto biocida é suficientemente eficaz, não tendo efeitos inaceitáveis nos organismos visados, na saúde dos seres humanos ou dos animais ou no ambiente; as propriedades físicas e químicas do produto foram consideradas aceitáveis no que respeita à utilização e ao transporte do produto; quando apropriado, foram estabelecidos limites máximos de resíduos nos géneros alimentícios e nos alimentos para animais para as substâncias ativas contidas num produto biocida; quando forem utilizados nano materiais no produto, os riscos para a saúde humana, para a saúde animal e para o ambiente foram avaliados separadamente”. Quanto a valores de emissão no ambiente, na Suécia o valor máximo admissível do bronopol nas águas é de 0,78 µg/L, sendo a concentração previsível em que não há efeitos nefastos (Remberger *et al.*, 2006). Quanto ao seu uso em produtos comerciais não pode exceder os 0,1% da massa total do produto, pois além deste valor poderá ter efeitos negativos para os consumidores. O bronopol pertence ainda às substâncias farmacologicamente ativas (Jornal Oficial da União Europeia, 2010) e segundo o Regulamento (CEE) n.º 2377/90 encontra-se inserido nas substâncias farmacológicas permitidas a serem administradas em peixes com barbatana que farão parte dos alimentos de origem animal, sendo que não é exigido um limite máximo de resíduos para o bronopol no animal.

## 1.2. Biocidas

Bronopol é um biocida de uso frequente em diversas atividades desde os anos 30, assim como o Hipoclorito de sódio, ocorrendo uma exposição contínua destes compostos nos ecossistemas. O seu uso (Diretiva 98/8/CE) tem como principal objetivo a higiene e saúde da população (espaços domésticos, espaços públicos, instituições - por exemplo, o combate à *Escherichia coli*), é também usado para a segurança do consumidor em vários produtos comercializados de venda ao público e é ainda usado para o bem estar animal (aplicações veterinárias – por exemplo, o combate à febre aftosa) e controlo de insetos (malária).

Contudo, a sua presença no meio ambiente através de descargas muitas das vezes, poderá levar a efeitos nefastos para os organismos que habitam o ecossistema, e a duração da exposição vai depender de alguns fatores, como por exemplo a solubilidade do composto na água e a sua capacidade de degradação. Ambos os compostos, S-HIP e BNP foram testados em invertebrados

aquáticos de água doce, o S-HIP foi testado em *Daphnia magna* e o BNP foi testado em *Daphnia magna* e em *Americamysis bahia*. Em estudos anteriores foi determinado o CE<sub>50</sub>, o CL<sub>50</sub>, o CEO e o CENO do BNP (USEPA, 2009) e do S-HIP (Shan-Shin *et al.*, 2012; Emmanuel *et al.*, 2004; Manning *et al.*, 1996; Panouillères *et al.*, 2007; Mattei *et al.*, 2006) (Tabela 1).

Tabela 1. CE<sub>50</sub>, CL<sub>50</sub>, CEO e CENO de S-HIP (Shan-Shin *et al.*, 2012; Emmanuel *et al.*, 2004; Manning *et al.*, 1996; Mattei *et al.*, 2006) e de BNP (USEPA, 2009) em *Daphnia magna* e *Americamysis bahia*

	BNP	S-HIP
CE <sub>50</sub> (24h)	_____	0,05 mg L <sup>-1</sup> 0,460 mg L <sup>-1</sup> 0.045 mg L <sup>-1</sup>
CE <sub>50</sub> (48h)	1,4 mg L <sup>-1</sup>	0,02 mg L <sup>-1</sup>
CE <sub>50</sub> (96h)	5,9 mg L <sup>-1</sup> ( <i>Americamysis bahia</i> )	_____
CL <sub>50</sub> (24h)	_____	0,08 mg L <sup>-1</sup>
CL <sub>50</sub> (48h)	_____	_____
CENO	0,066 mg L <sup>-1</sup>	0,048 mg L <sup>-1</sup>

Assim, devido à exposição contínua destas substâncias é importante verificar o impacto da presença destes compostos nos ecossistemas, verificando quais as consequências que advêm da sua exposição aos organismos aquáticos.

### 1.2.1. Bronopol

O Bronopol, pesticida orgânico (Figura 1) é um dos compostos químicos usados para a conservação de produtos, e como tal, é usado em diversas áreas, desde os cosméticos à indústria alimentar (Tezel e Pavlostathis, 2009) atuando ainda como slimicida<sup>1</sup> e bactericida em processos industriais, como por exemplo na indústria do papel (USEPA, 2005). O objetivo da utilização do BNP é impedir a proliferação de microrganismos, esta ação é conseguida através da membrana ativa catiónica levando a uma forte ação sob os vírus, as algas e as bactérias. Contudo, o seu uso

<sup>1</sup> Inibição da produção de microrganismos através da formação de uma camada protetora envolta do produto a ser conservado

nos produtos comerciais não pode exceder os 0,1% da massa total, de forma a evitar a produção de nitrosaminas (compostos químicos cancerígenos), pois pode ser prejudicial para os consumidores (REPCC, 2009).

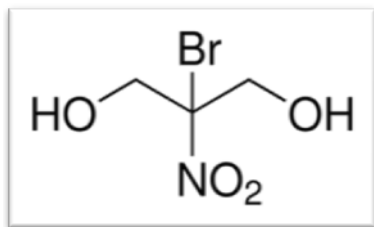


Figura 1. Estrutura química do Bronopol (adaptado de Sigma-Aldrich)

O BNP em condições aeróbicas, oxida cataliticamente substâncias que contenham tiol (cisteína) e os sub-produtos que advêm desta reação são radicais, o superóxido e o peróxido que são diretamente responsáveis pela atividade bactericida do composto e pela taxa de crescimento reduzida após o período bacteriostático (HSDB, 2004). O metabolito encontrado em maior quantidade nos organismos que entram em contato com o BNP é o 2-nitropropano-1,3-diol (HSDB, 2004).

O BNP é um composto bastante solúvel em água, por isso nos ecossistemas não é esperado que seja bioacumulado (Dye *et al.*, 2007) é ainda uma substância de baixa toxicidade, ao contrário dos seus produtos de transformação. É um composto instável no ambiente (Dye *et al.*, 2007 e Remberger *et al.*, 2006), e, por isso, será degradado rapidamente ou estará presente em concentrações mínimas (Dye *et al.*, 2007). Por ser uma substância com uma atividade anti-microbiana elevada, facilmente é biodegradada no ambiente (EPA, 2006), passando pelos processos de hidrólise e de fotólise (USEPA e RED, 1996).

Devido à sua instabilidade no ambiente, as substâncias que se encontram em maior quantidade são os produtos de degradação, o 2-bromo-2-nitroetanol (BNE) e o bromonitrometano (BNM) (Cui *et al.*, 2011) que conseguem ser mais tóxicos e mais resistentes à degradação do que o composto inicial; dos produtos de degradação o BNM é o composto mais tóxico. Segundo os estudos de Cui *et al.* (2011), o processo de hidrólise do BNP e do BNE é acelerado quando o pH é neutro e/ou ligeiramente alcalino, o BNE quando presente no ambiente é mais estável que o BNP. Sabe-se que o aumento da temperatura acelera a degradação do BNP (Matczuk *et al.*, 2012), fato que merece alguma atenção, podendo ser objeto de futuros estudos devido às alterações climáticas que se vem vindo registando.

Assim, apesar da utilização constante do BNP por diversas áreas, são os produtos de transformação (BNE e BNM) que de uma forma indireta vão ter um maior impacto no ambiente.

### 1.2.2. Hipoclorito de sódio

O hipoclorito de sódio (Figura 2), mais conhecido como lixívia é um biocida muito utilizado em desinfecção de pavimentos e em desinfecção de águas de consumo (ETAs) e de águas residuais (ETARs), devido à sua boa eficácia na remoção de patógenos e ao fato de ser uma substância de baixo custo. Uma das consequências que advém da utilização do S-HIP é o cloro residual, pois quando combinado com a amónia presente nos ecossistemas forma as cloraminas inorgânicas que são muito tóxicas para os organismos aquáticos.

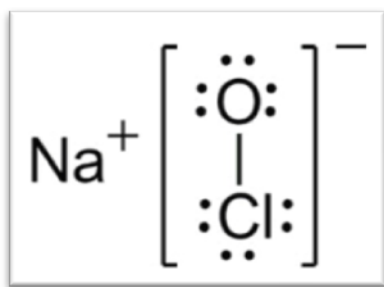


Figura 2. Estrutura química do hipoclorito de sódio

O mecanismo de ação do S-HIP é baseado na oxidação da matéria orgânica (Figura 3), após a adição de um composto que contenha cloro, neste caso o S-HIP (Emmanuel *et al.*, 2004). Seguidamente o S-HIP vai reagir com a amónia ( $\text{NH}_3$ ) presente no meio, formando as cloraminas inorgânicas (cloro residual), altamente tóxicas para os organismos aquáticos. Após a formação das cloraminas obtém-se a presença do cloro livre através da dissociação do  $\text{HClO}$  (Figura 4), sendo que a presença dos compostos formados após a dissociação ( $\text{H}^+$  e  $\text{ClO}^-$ ) é que vão fornecer a atividade bactericida, de forma a eliminar os microrganismos (Emmanuel *et al.*, 2004). O ácido hipocloroso como biocida é mais eficiente que o ião hipoclorito e tem uma melhor eficiência num pH que se situe entre 6 e 9 (Lopez *et al.*, 2001), pois quanto menor for o pH mais eficiente será o processo de desinfecção.



Figura 3. Formação do ácido hipocloroso aquando a utilização do S-HIP como fonte de cloro



Figura 4. Dissociação do ácido hipocloroso

O ácido hipocloroso e o  $\text{CLO}^-$  quando presentes podem reagir com compostos orgânicos (Emmanuel *et al.*, 2004) por adição (Figura 5), substituição (Figura 6) e oxidação (Figura 7) formando seguidamente novos compostos, por vezes ainda mais tóxicos (Emmanuel *et al.*, 2004), como por exemplo, os compostos halogenados (Figura 8).



Figura 5. Reação de adição do HCLO



Figura 6. Reação de substituição do HCLO

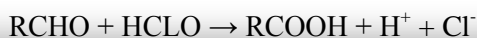


Figura 7. Reação de oxidação do HCLO



Figura 8. Formação de compostos halogenados (clorofórmio)

Os metabolitos (HDSB, 2003) que se podem formar nos organismos que entram em contato com este composto é o ácido dicloroacético (DCA), ácido tricloroacético (ATA), dicloroacetonnitrilo (DCAN) e tricloroacetonnitrilo (TCAN).

O hipoclorito de sódio é um composto instável no ambiente, devido à sua fotossensibilidade (Patrícia *et al.*, 2008) e, quando presente nos ecossistemas sob a forma de cloro residual combina-se com a amónia ( $\text{NH}_3$ ) formando as cloraminas inorgânicas (Margerum *et al.*, 1994) que são bastante tóxicas, nomeadamente para os organismos aquáticos.

Existem estudos (Tabela 2) que comprovam que concentrações de cloro residual total inferior a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  provocam efeitos letais e sub-letais em *Ceriodaphnia dubia* (Taylor, 1993 e Szal *et al.*, 1991), e segundo a USEPA (2012) o total de cloro residual presente na água para

descarga não deve exceder os 631 µg/L/dia e não deve exceder os 456 µg/L/mês. Em outros estudos, nomeadamente de Manning *et al* (2006) foi comprovado os malefícios do uso do Hipoclorito de sódio com efeitos sub-letais em *Ceriodaphnia dubia* e em *Daphnia magna* com efeitos sub-letais e letais (USEPA, 1984; Mattei *et al.*, 2006 ), foi ainda comprovado que o S-HIP diminui aproximadamente 50% da produção de juvenis de *Daphnia magna* segundo os estudos de Mattei *et al* (2006), diminuindo a taxa de natalidade. Por conseguinte surgem impactos negativos no ecossistema, visto que *D.magna* é um dos organismos da base da cadeia trófica que assegura a manutenção dos ecossistemas ecológicos.

Tabela 2. Valores de CE<sub>50</sub>, CL<sub>50</sub>, CEO e CENO do S-HIP em *Ceriodaphnia magna* (Manning *et al*, 2006) e em *Daphnia magna* (USEPA, 1984; Mattei *et al.*, 2006)

S-HIP	CL <sub>50</sub> (24h)	CE <sub>50</sub> (24h)	CE <sub>50</sub> (48h)	CEO	CENO
<i>Daphnia magna</i>	0,08 mg L <sup>-1</sup>	_____	0,045 mg L <sup>-1</sup>	_____	_____
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	_____	0,26 mg L <sup>-1</sup>	_____	0,66 mg L <sup>-1</sup>	0,048 mg L <sup>-1</sup>

### 1.3. *Daphnia magna* como organismo de estudo

A *Daphnia magna* (Figura 9) é um microcrustáceo de água doce, com um comprimento entre 0,2 e 5mm, movimenta-se na água com o auxílio das segundas antenas, e como todos os crustáceos possui uma carapaça que sofre uma muda diária, exceto nos 3 dias em que tem os ovos na câmara incubadora ao longo das ninhadas. É conhecida como a pulga de água doce e encontra-se na base da cadeia alimentar, assegurando a estabilidade da cadeia trófica e do ecossistema.

A *Daphnia magna* sendo um organismo filtrador ativo acaba por ser um ótimo organismo de estudo na área da toxicologia, pois filtra o tóxico ou os tóxicos presentes na água, podem ingerir o alimento presente na água já tóxico e, podem ainda absorver a toxicidade dos compostos através do seu exoesqueleto (Donna *et al.*, 2002). Segundo os estudos de Moore (1982, 1990) e de Svendsen *et al* (2004) muitos dos tóxicos presentes no ambiente têm o poder de afetar a integridade e a permeabilidade das membranas biológicas dos organismos, ou seja, os organismos sofrem uma intoxicação, resultando num efeito letal e/ou sub-letal ou podem sofrer um processo de destoxificação, processo pelo qual os seres-vivos excretam o tóxico do organismo através de um conjunto de processos de biotransformação. Contudo, ambos os processos, intoxicação e destoxificação, vão depender de vários fatores, entre eles o tipo de tóxico, a via de administração, a quantidade e o tempo de exposição à qual o organismo está exposto (Rand e Petrocelli, 1985).





Figura 9. *Daphnia magna* com ovos

É uma espécie muito usada em bio-ensaios toxicológicos, entre eles os testes requeridos pela legislação nacional e europeia para a avaliação ecotoxicológica de novos agentes químicos, de efluentes urbanos e industriais e de ecossistemas de água doce, por isso, são efetuados ensaios toxicológicos crónicos e agudos para quantificar e avaliar qualitativamente a toxicidade de um determinado composto (OCDE, 2012; ASTM, 1994). Os métodos biológicos têm a função de fornecer uma ideia geral do que se passa com o ecossistema, sendo essenciais para a avaliação citotóxica e genotóxica dos organismos expostos mas para a avaliação ser completa esta deve ser acompanhada por métodos químicos e físicos, de forma a fazer uma avaliação qualitativa e quantitativa dos compostos presentes no ecossistema, sendo que todos os métodos se complementam. As vantagens que se destacam da utilização de *Daphnia magna* como modelo biológico em diferentes atividades experimentais é (I) serem organismos com uma morfologia bastante simples, (II) terem um ciclo de vida extremamente curto, (III) requererem pouco espaço, (IV) adaptarem-se facilmente às condições laboratoriais, (V) serem facilmente manipuláveis e (VI) serem extremamente sensíveis à toxicidade, além da resposta face à toxicidade do composto poder ser avaliada do ponto de vista comportamental e fisiológico (Michels *et al.*, 2000).

Desta forma, a *Daphnia magna* tem uma importância ecológica bastante elevada tornando-se muito útil na área de investigação do ponto de vista toxicológico e ecotoxicológico, auxiliando no estudo da qualidade da água (Petlier e Weber, 1985). É um dos organismos mais bem estudados, não só pela sua alta sensibilidade a tóxicos mas também por estar na base da cadeia trófica, alimentando-se do fitoplâncton servindo depois de alimento a pequenos vertebrados

(Dettmers e Stein, 1992), é ainda uma espécie amplamente distribuída funcionando como um bio-indicador da qualidade da água (Dodson *et al.*, 1999), sendo que a sua utilização para detecção de compostos tóxicos provenientes de descargas industriais e de ETARs é muito frequente (EPS, 1990).

De acordo com a CE 1272/2008, os organismos de referência como a *Daphnia magna* quanto à avaliação da toxicidade aquática têm que ter um  $CE_{50}$  superior a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , representando um valor não prejudicial para o ambiente.

Os embriões e os juvenis de *Daphnia magna* são frequentemente estudados, pois são estágios nos quais o sistema imunológico ainda não se encontra 100% apto para responder aos efeitos dos tóxicos, as fêmeas adultas são estudadas de forma a avaliar a reprodução e o crescimento, pois são mecanismos que asseguram a continuidade da espécie.

O comportamento frequentemente estudado e avaliado durante os ensaios toxicológicos é o comportamento fototático, e segundo Di Delupis e Rotondo (1988) este comportamento funciona como um bio-indicador da presença de poluentes, sendo que os compostos podem ser rapidamente detetados. O comportamento fototático pode ser indicativo de contaminação (não há sinal de movimentação) ou de não contaminação (presença de movimentação), este tipo de comportamento é o resultado da interação do sistema nervoso com o sistema muscular (Di Delupis e Rotondo, 1988), ou seja, na presença de um tóxico o sistema nervoso é afetado impossibilitando o funcionamento do sistema muscular, ocorrendo a ausência de movimentação tornando-se numa característica de fácil avaliação. No entanto, nos estudos de Michels e De Meester, (1998) o comportamento fototático também pode variar com os fatores abióticos (temperatura, pH e o oxigénio dissolvido na água).

### 1.3.1. Reprodução em *Daphnia magna*

A *Daphnia magna* é uma espécie que possui dois tipos de reprodução, a reprodução assexuada e a reprodução sexuada, o que determina o tipo de reprodução são as condições ambientais. Maioritariamente o tipo de reprodução é assexuada partenogénica, a reprodução sexuada apenas acontece quando as condições ambientais são desfavoráveis. Na reprodução assexuada partenogénica todos os descendentes são semelhantes (clones) à progenitora, pois não ocorre recombinação genética como ocorre na reprodução sexuada. Os machos distinguem-se das fêmeas pela primeira antena que é maior que nas fêmeas (Figura 10), e são produzidos durante um curto período de tempo (Outono e Primavera) quando as condições ambientais não são as mais

propícias para se dar a reprodução assexuada. O número de gerações ao longo de um ano é elevado mas segundo Dodson e Frey (1991) a produção de machos fica bem abaixo dos 50%. Contudo, o aumento na produção de machos vai baixar a taxa de reprodução, pois a reprodução sexuada é mais lenta que a reprodução assexuada levando a uma diminuição da população que de certa forma é responsável pelo equilíbrio e manutenção dos ecossistemas, acabando por ter efeitos negativos para a cadeia trófica (Danielle *et al.*, 2010).

Quando a população é normal e saudável, os organismos reproduzem-se por partenogénese, mas se não existem fatores que propiciem este tipo de reprodução como o fotoperíodo e a temperatura (Carvalho e Hughes, 1983), a disponibilidade e a qualidade do alimento (Hobaek e Larsson, 1990) vai ocorrer a reprodução sexuada, assegurando a descendência. Os ovos que posteriormente irão eclodir quando as condições forem favoráveis ficam num período de latência em que são resistentes à dissecação, às temperaturas altas e à digestão quando são ingeridos por alguns organismos (Arbaciauskas, 1998). Nos estudos de Tatarazako *et al* (2003) o sexo dos juvenis pode ser usado como indicador de perturbação endócrina, pois existem compostos tóxicos que mimetizam as hormonas juvenis alterando todo o processo fisiológico de reprodução.

Neste estudo, serão usadas espécies mantidas e cultivadas em laboratório, logo as condições ambientais são favoráveis e constantes, sucedendo apenas a reprodução partenogénica, originando inúmeros descendentes geneticamente idênticos às fêmeas progenitoras permitindo eliminar a variabilidade genética nos bio-ensaios, ou seja, os organismos expostos aos tóxicos tendem a responder todos da mesma forma. O seu ciclo de vida varia entre cerca de 40 dias a 25°C e 56 dias a 20°C, os juvenis nascem a cada 3 dias e a primeira ninhada nasce em 8 a 10 dias, os ovos são apenas libertados quando as fêmeas mudam a sua carapaça.



Figura 10. Macho (1) e fêmea (2). O macho possui uma segunda antena maior que a fêmea (seta), não tem câmara de ovos (círculo) e possui uma pequena protuberância (\*)

## 2. Objetivos

Como a desinfecção e a conservação são processos muito importantes em diferentes áreas e a diferentes níveis, e como tal imprescindíveis em alguns tratamentos e fabrico de produtos comerciais é fulcral saber quais os efeitos que o bronopol e o hipoclorito de sódio tão frequentemente utilizados têm nos nossos ecossistemas.

Desta forma, o principal objetivo deste estudo é avaliar a toxicidade de ambos os compostos e verificar qual o impacto no ambiente que resulta da utilização dos mesmos. O hipoclorito de sódio é a substância principal ativa na lixívia e o bronopol é usado como conservante em vários produtos. Contudo, o bronopol será apenas o ponto de partida para o estudo do bromonitroetanol, pois devido à instabilidade do bronopol este é rapidamente degradado, sendo que o estudo será apoiado no bromonitroetanol sendo um dos produtos de degradação produzido em maiores quantidades e que permanece durante mais tempo (Cui *et al*, 2011). O estudo consistirá em três tarefas: a primeira será a aprendizagem quanto aos métodos de cultura de *Daphnia magna* que será usada nos bioensaios ecotoxicológicos e de *Chlorella vulgaris*, alga de água doce que serve de alimento a *Daphnia magna*, a segunda tarefa será testar os métodos espectrofotométricos para determinação das concentrações dos compostos usados nos bioensaios de *Daphnia magna*, e por último será efetuar as retas de calibração e verificar a degradação do S-HIP e do BNP ao longo do tempo.

## 3. Material e Métodos

Os biocidas escolhidos para os bioensaios ecotoxicológicos em *Daphnia magna* foram o bronopol e o hipoclorito de sódio. Nos bioensaios foram usados o bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-ol) (CAS number: 52-51-7) com um grau de pureza de 98%, fornecido pela empresa Sigma-Aldrich, e uma formulação comercial contendo hipoclorito de sódio (PingoDoce Ultra Pro) com um teor de 88,164 g L<sup>-1</sup>.

### 3.1.Organismo teste

O modelo biológico utilizado ao longo do estudo foi a *Daphnia magna*, um microcrustáceo de água doce, representante importante das comunidades bentônicas e zooplantônicas dos ecossistemas de água doce (Ruppert *et al.*, 2004).

É um organismo com inúmeras vantagens, entre elas a facilidade de manuseamento em laboratório, além de ser um dos organismos mais utilizados pela comunidade científica. Assim, é considerado um organismo de resposta rápida na avaliação da exposição a stressores existentes no ambiente aquático.

### 3.2.Culturas de *Daphnia magna*

O modelo biológico escolhido para este estudo foi *Daphnia magna*, devido à sua facilidade de ser mantida em laboratório e à sua sensibilidade quanto ao efeito dos agentes químicos. Em todos os ensaios realizados ao longo do estudo foram utilizados organismos da mesma estirpe, nomeadamente o “clone A” (*sensus* Baird *et al.*, 1989), mantida em culturas desde há mais de 15 anos no Laboratório de Ecotoxicologia do ICBAS e no Laboratório de Ecotoxicologia e Ecologia do CIIMAR.. Efetuaram-se culturas individuais (Figura 11), mantidas em reprodução assexuada de forma a diminuir a influência da variabilidade genética nos bioensaios, em recipientes de vidro de 200 mL para a obtenção dos juvenis necessários aos ensaios agudos e crónicos. Os recipientes foram parcialmente tapados para permitir as trocas gasosas essenciais ao desenvolvimento de *Daphnia magna*; aos frascos de 200 mL foi adicionado 100 mL de água dura ASTM (ASTM, 1980), doravante designado por ASTM, cuja composição se apresenta em anexo (Anexo I, Tabela 12), enriquecido com 0,4 mL de um extrato de *Ascomyllum nodosum* (Baird *et al.*, 1989), preparado conforme indicado em Anexo (Anexo II) por cada 100 mL de meio e um complexo vitamínico (tiamina (B1), biotina (H) e cianocobalamina (B12)), pois o meio do ASTM é pobre em nutrientes.



Figura 11. Culturas parentais individuais de *Daphnia magna*, mantidas em laboratório a  $20\pm 1^\circ\text{C}$

Todas as culturas de *D. magna* foram iniciadas com organismos provenientes da terceira ninhada, sendo mantidos numa sala aclimatizada com temperatura de  $20^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$  e com um fotoperíodo de 16h luz: 8h escuro. O meio das culturas de *D. magna* foi renovado três vezes por semana, preparando-se novos recipientes de cultura com meio e alimento frescos, sendo que as fêmeas e/ou juvenis foram transferidas dos frascos de cultura com meio envelhecido para os frascos com meio fresco com o auxílio de uma pipeta de plástico de 5mL. O alimento era constituído por uma suspensão de *Chlorella vulgaris*, correspondendo a uma ração diária de  $3\times 10^5$  células/mL/dáfnia, preparado a partir de culturas laboratoriais mantidas para o efeito, conforme descrito na secção seguinte. Em cada geração as fêmeas eram mantidas até ao nascimento da quinta ninhada, a partir desta as fêmeas eram rejeitadas e eram substituídas pelos juvenis iniciando novamente o mesmo processo, nos ensaios eram usados os juvenis da terceira ninhada, pois era a ninhada com mais juvenis. Os agentes químicos utilizados para preparar o meio ASTM, nomeadamente  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , KCl e  $\text{CaSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , foram fornecidos pela empresa Sigma-Aldrich. As vitaminas utilizadas foram fornecidas pela empresa Sigma-Aldrich. Em todas as soluções foi sempre utilizada água ultra pura (u.p) produzida utilizando o equipamento Millipore Progard 2.

### 3.3. Cultura de *Chlorella vulgaris* e preparação de alimento para *D. magna*

O meio de cultura utilizado para manutenção da microalga *Chlorella vulgaris* foi o MBL (MBL), (Stein, 1973), sendo mantida num compartimento com um fotoperíodo de 24h luz para se obter um crescimento máximo, e temperatura de  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , com arejamento contínuo através de um filtro de  $0,22\ \mu\text{m}$  (Spritzen/Syringe-Filter). Para manter as culturas em fase exponencial de crescimento, de modo a evitar a produção de metabolitos da alga tóxicos para *D. magna* o meio era parcialmente renovado periodicamente três vezes por semana. Quando a cultura atingia a sua fase exponencial, ao 7º dia, eram retirados inóculos líquidos aseticamente e armazenados a  $4^\circ\text{C}$  para

futuras culturas, os inóculos líquidos têm apenas a duração de 3 meses no máximo. As culturas foram mantidas em condições de assepsia, em erlenmeyers de 5L com 4L de MBL, este meio foi preparado com água destilada, com micronutrientes e macronutrientes (Anexo III, Tabela 13), sendo que as soluções de reserva de macronutrientes, micronutrientes e de tampão foram preparadas em água ultra-pura de condutividade inferior a 5  $\mu\text{S}/\text{cm}$  e armazenadas a 4°C, sendo utilizadas por um período máximo de 1 mês. A Figura 12 ilustra o sistema de culturas utilizado.

Os recipientes contendo o meio de cultura foram sempre previamente esterilizados por autoclavagem (Uniclave 88) durante 60 minutos a 124°C. Após arrefecimento à temperatura ambiente, foram adicionados 0,5 mL da solução de vitaminas (Anexo IV) e 10 mL de inóculo líquido de *C.vulgaris* por cada 4L de meio.



Figura 12. Cultura de *Chlorella vulgaris*, em que 1 é o tubo de arejamento, 2 é o tubo de saída de ar e 3 é o tubo de troca de meio

O alimento para *D.magna* foi preparado duas vezes por semana. Para o efeito, eram retirados 2L da cultura de *C. vulgaris*, os quais eram centrifugados, durante 7 minutos a 3500 rpm numa centrífuga Kubota 5400. O sobrenadante era rejeitado e o sedimento contendo as algas era ressuspensionado em meio ASTM com vitaminas. Desta suspensão retirava-se uma amostra, a qual se diluía 1:10 (v/v), sendo a sua absorvência a 440nm lida num espectrofotómetro (Spectra Max M<sub>2</sub>). A concentração de algas da suspensão era então calculada a partir de uma relação absorvência *versus* número de células da alga, obtida previamente. Esta relação é apenas linear entre 0,4 e 0,8 unidades de absorvência, pelo que quando a suspensão de células tinha um valor superior era diluída de forma à sua absorvência se situar naquele intervalo, o que permitia calcular o volume necessário a adicionar às culturas de *D. magna* de forma a se obter a ração diária pretendida ( $3 \times 10^5$  células/mL/dáfnia). A suspensão de algas era armazenada a 4°C por um período máximo de 3 dias ou a -20°C por um período máximo de 3 meses.

### 3.2. Avaliação da adequabilidade das culturas parentais para uso em ensaios ecotoxicológicos

O ensaio com dicromato de potássio (substância de referência) foi realizado seguindo o protocolo nº 202 da OCDE (OCDE, 2004), numa sala com controlo de temperatura ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo 16h luz:8h escuro. Resumidamente, foi preparada uma solução de reserva de dicromato de potássio em água u.p. com uma concentração  $2500\text{ mg L}^{-1}$ . Desta solução, foi retirado 1 mL, os quais foram diluídos em 500 mL de ASTM sem vitaminas; a partir desta solução foram preparadas mais 6 por diluições sucessivas 1: 2 (v/v). Obtiveram-se assim as soluções-teste correspondendo aos tratamentos de dicromato de potássio cujos efeitos se pretendiam avaliar: 5,00; 2,50; 1,25; 0,62; 0,31 e  $0,16\text{ mg L}^{-1}$ . O meio do tratamento controlo foi ASTM sem vitaminas.

Foram utilizados 20 juvenis (com mais de 6h e menos de 24 horas de idade no início do bioensaio) por tratamento, seleccionados ao acaso entre juvenis produzidos na terceira ninhada por fêmeas mantidas nas condições descritas na secção 2.1. Os organismos foram expostos em recipientes de vidro de 100 mL de capacidade, contendo 50 mL de meio, em grupos de 5 organismos por recipiente (Figura 13). O ensaio durou 48 h, não foi fornecido alimento e o meio não foi renovado. No início do ensaio e a cada 24h foram medidos os seguintes parâmetros da água: oxigénio dissolvido (DO); pH, temperatura e condutividade, utilizando a sonda Multi 340i (Anexo V, Tabela 14). O critério de efeito tóxico foi a morte, reconhecida pela imobilização dos juvenis durante 15 segundos sob estimulação de um estímulo luminoso (ISO 6341, 1996), registada às 24h.

No final do ensaio foi calculada a percentagem de mortalidade em cada tratamento e traçadas as curvas de toxicidade (logaritmo de base 10 da concentração de dicromato de potássio *versus* o valor em unidades probite da percentagem de mortalidade) (Finney, 1971). O valor da concentração mediana letal ( $CL_{50}$ ) e respectivo intervalo de confiança a 95% (95%IC) foram calculados a partir das curvas de toxicidade utilizando o programa SPSS (versão 20.0).



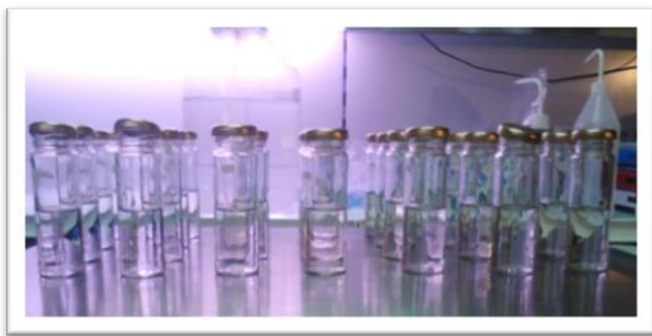


Figura 13. Vista parcial do ensaio de toxicidade realizado expondo *Daphnia magna* ao dicromato de potássio

### 3.3.Otimização das condições para determinação da concentração das substâncias-teste por espectrofotometria durante os bioensaiois

Com a finalidade de avaliar se seria possível determinar as concentrações reais das substâncias-teste e a sua eventual degradação durante os bioensaiois por espectrofotometria, foram preparadas soluções de lixívia comercial e de bronopol em água u.p. e em ASTM. Todas as leituras de absorvência foram efectuadas num espectrofotómetro Spectra Max M<sub>2</sub>.

As soluções de lixívia foram preparadas diluindo 1,59 mL da formulação comercial, a qual continha 88,164 g L<sup>-1</sup> de hipoclorito de sódio, em 100 mL de água u.p. ou e em ASTM, ficando assim com uma concentração final de 1,4 g L<sup>-1</sup>. Destas soluções, doravante designadas por soluções iniciais de hipoclorito de sódio, foram preparadas em triplicado. De cada uma delas, foi retirada uma amostra e efectuado um espectro de absorção (varrimento total, lendo a absorvência continuamente de 200 a 900 nm), utilizando água u.p. ou ASTM como branco, conforme apropriado. O hipoclorito de sódio tem um pico de absorvência a 292 nm (March e Simonet, 2007), pelo que este comprimento de onda foi utilizado como base para fazer curvas de calibração absorvência *versus* concentração de hipoclorito de sódio. Para o efeito, a partir das soluções iniciais de hipoclorito de sódio, foram efectuadas diluições sucessivas 1:2 (v/v) em água u.p. e em ASTM com as seguintes concentrações de hipoclorito de sódio: 1400; 700; 350; 175; 87,5; 43,75; 21,89; 10,94 e 5,47 mg L<sup>-1</sup>, sempre em triplicado a partir das respectivas soluções iniciais. Foi depois ajustado um modelo de regressão linear aos dados, utilizando a absorvência (a partir da qual se pretendia posteriormente determinar a concentração da substância-teste nos bioensaiois) como variável independente e a concentração nominal da substância como variável dependente.

Em soluções aquosas o bronopol degrada-se rapidamente em vários produtos de degradação, principalmente em bromonitroetanol, e bromonitrometano (Cui *et al*, 2011). O

bromonitroetanol tem um pico de absorvência a 244 nm (Sanyal *et al*, 1996), pelo que a monitorização da concentração de BNP e a sua degradação pode ser efectuada indirectamente através do aparecimento do pico de absorvência a 244 nm devido à formação do bromonitroetanol à medida que o BNP se vai degradando (Sanyal *et al*, 1996). Assim, foram preparadas três soluções iniciais de BNP em água u.p. e três soluções iniciais de BNP em ASTM com uma concentração nominal de 4 mg L<sup>-1</sup>. De cada uma delas, foi retirada uma amostra e efectuado um espectro de absorção (varrimento total, lendo continuamente a absorvência de 200 a 900 nm). A partir de cada solução inicial de água u.p. e de ASTM, foram efectuadas diluições sucessivas 1:2 (v/v) em água u.p. e ASTM, respectivamente, tendo-se obtido as seguintes concentrações nominais de BNP: 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,13 mg L<sup>-1</sup>. De acordo com Sanyal (1996) foi depois ajustado um modelo de regressão linear aos dados, utilizando a absorvência (a partir da qual se pretendia posteriormente determinar a concentração da substância-teste nos bioensaios) como variável independente e a concentração nominal de bromonitroetanol como variável dependente.

### 3.4. Bioensaio com lixívia comercial

Após o teste de sensibilidade, foi realizado um ensaio preliminar de 96h com uma solução comercial de hipoclorito de sódio (PingoDoce UltraPro) em *Daphnia magna*. Foram recolhidas amostras de todos os frascos de ensaio, de forma a medir-se a absorvência de todos e de obter uma média por cada concentração. O ensaio teve como objetivo uma adaptação prática ao trabalho laboratorial assim como uma adaptação aos futuros ensaios com o bronopol. O objetivo deste ensaio agudo foi testar o hipoclorito de sódio presente na lixívia comercial na concentração nominal de 88,164 g L<sup>-1</sup>. Deste modo, foi retirado 1,93 µL de 1L da lixívia comercial para um balão volumétrico de 1000 mL onde se acrescentou ASTM sem vitaminas obtendo-se uma concentração nominal de 0,17 mg L<sup>-1</sup>. Partindo desta solução fez-se mais 6 diluições de 1:2 (v/v), sendo que as concentrações escolhidas para o tratamento foram: 0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,08; 0,11 e 0,17 mg L<sup>-1</sup>. O tratamento de controlo foi efectuado com ASTM sem vitaminas. Durante o ensaio não foi fornecido alimento e o meio não foi renovado. No início do ensaio e a cada 24h foram medidos os seguintes parâmetros da água: oxigénio dissolvido (DO); pH, temperatura e condutividade, utilizando a sonda Multi 340i (Anexo VI, Tabela 15). O critério de efeito tóxico foi a morte, reconhecida pela imobilização dos juvenis durante 15 segundos sob estimulação de um estímulo luminoso (ISO 6341, 1996), registada às 24, 48 e 96h. Foram utilizados 20 juvenis (com mais de 6h e menos de 24 horas de idade no início do bioensaio) por tratamento, seleccionados ao acaso entre juvenis produzidos na terceira ninhada por fêmeas mantidas nas condições descritas na secção 3.2 os organismos foram expostos em recipientes de vidro de 100 mL de capacidade, contendo 50 mL de meio, em grupos de 5 organismos por recipiente.

No final do ensaio foi calculada a percentagem de mortalidade em cada tratamento e traçadas as curvas de toxicidade (logaritmo de base 10 da concentração de dicromato de potássio *versus* o valor em unidades probite da percentagem de mortalidade) (Finney, 1971). O valor da concentração mediana letal (CL<sub>50</sub>) e respectivo intervalo de confiança a 95% (95%IC) foram calculados a partir das curvas de toxicidade utilizando o programa SPSS (versão 20.0).

### 3.5. Bioensaio com bronopol e seus produtos de degradação

Foi efetuado um ensaio agudo com o bronopol, em *Daphnia magna*. O objetivo deste ensaio agudo foi testar o bronopol através dos seus produtos de degradação, sendo que o bromonitroetanol é um dos compostos produzidos em maior quantidade (Cui *et al*, 2011), e como tal foi através deste que se mediu a degradação do bronopol. Deste modo foi retirado 2 mg de bronopol para um balão volumétrico de 500 mL onde se acrescentou ASTM sem vitaminas obtendo-se uma concentração nominal de 4 mg L<sup>-1</sup>. Partindo desta solução fez-se mais 5 diluições de 1:2 (v/v), sendo que as concentrações escolhidas para o tratamento foram: 0,13; 0,25; 0,50; 1; 2 e 4 mg L<sup>-1</sup>. O tratamento de controlo foi efetuado com ASTM sem vitaminas. O ensaio durou 96h, não foi fornecido alimento e o meio não foi renovado. No início do ensaio e a cada 24h foram medidos os seguintes parâmetros da água: oxigénio dissolvido (DO); pH, temperatura e condutividade, utilizando a sonda Multi 340i (Anexo VII, Tabela 16). O critério de efeito tóxico foi a morte, reconhecida pela imobilização dos juvenis durante 15 segundos sob estimulação de um estímulo luminoso (ISSO 6341, 1996), registada às 24, 48 e 96h. Foram utilizados 20 juvenis (com mais de 6h e menos de 24 horas de idade no início do bioensaio) por tratamento, seleccionados ao acaso entre juvenis produzidos na terceira ninhada por fêmeas mantidas nas condições descritas na secção 3.2 os organismos foram expostos em recipientes de vidro de 100 mL de capacidade, contendo 50 mL de meio, em grupos de 5 organismos por recipiente. No final do ensaio foi calculada a percentagem de mortalidade em cada tratamento e traçadas as curvas de toxicidade (logaritmo de base 10 da concentração de dicromato de potássio *versus* o valor em unidades probite da percentagem de mortalidade) (Finney, 1971). O valor da concentração mediana letal (CL<sub>50</sub>) e respectivo intervalo de confiança a 95% (95%IC) foram calculados a partir das curvas de toxicidade utilizando o programa SPSS (versão 20.0).

Foi efetuado um ensaio crónico com o bronopol, em *Daphnia magna*. O objetivo deste ensaio crónico foi testar o bronopol através dos seus produtos de degradação e verificar quais os efeitos de *Daphnia magna* a nível reprodutivo; sendo que o bromonitroetanol é um dos compostos produzidos em maior quantidade (Cui *et al*, 2011) foi através deste que se mediu a degradação do bronopol. As concentrações nominais foram escolhidas a partir do ensaio agudo, ou seja, a

concentração mais baixa utilizada no ensaio agudo e a qual não provocou mortalidade durante as 96 horas (0,125 mg L<sup>-1</sup>) foi a concentração mais alta escolhida para o ensaio crónico. Deste modo foi preparada uma solução de 12,5 mg L<sup>-1</sup> de bronopol num balão volumétrico de 1000 mL onde depois se retirou 1 mL para um balão volumétrico de 500 mL onde se acrescentou ASTM sem vitaminas obtendo-se uma concentração nominal de 0,125 mg L<sup>-1</sup>. Partindo desta solução fez-se mais 5 diluições de 1:2 (v/v), sendo que as concentrações escolhidas para o tratamento foram: 0,004; 0,008; 0,02; 0,03; 0,06 e 0,125 mg L<sup>-1</sup>. O tratamento de controlo foi efetuado com ASTM com vitaminas. O ensaio durou 21 dias, sendo fornecido alimento diariamente, 3x10<sup>5</sup> células/mL/dáfnia de *Chlorella vulgaris* e 0,2 ml de *Ascomyllum*, o meio foi renovado a cada 48 horas. No início do ensaio e a cada 24h foram medidos os seguintes parâmetros da água: oxigénio dissolvido (DO); pH, temperatura e condutividade, utilizando a sonda Multi 340i (Anexo VIII, Tabela 17,18,19 e 20). O critério de efeito tóxico foi o número de juvenis e o número de ovos abortados produzidos por cada fêmea. Foram utilizados 10 juvenis (com mais de 6h e menos de 24 horas de idade no início do bioensaio) por tratamento, seleccionados ao acaso entre juvenis produzidos na terceira ninhada por fêmeas mantidas nas condições descritas na secção 2.1. Os organismos foram expostos em recipientes de vidro de 100 mL de capacidade, contendo 50 mL de meio, foram efetuadas 10 réplicas por tratamento com 1 juvenil por cada réplica. No final do ensaio foi efetuada uma análise de variância (ANOVA) a todos os grupos de tratamento verificando-se se havia diferenças significativas entre os grupos de tratamento relativamente ao controlo e se havia diferenças significativas entre as réplicas por cada tratamento utilizando o programa SPSS (versão 20.0).

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Estado das culturas parentais de *Daphnia magna*

A adequabilidade do estado das culturas parentais, cujos juvenis se pretendiam usar nos ensaios ecotoxicológicos foi avaliado, através da análise do número e viabilidade dos juvenis produzidos nas primeiras três ninhadas e realizando um bioensaio com uma substância de referência (dicromato de potássio), tal como recomendado pelas normas da OCDE para bioensaios com *D. magna* (ISO 6341, 1996). Assim, das culturas mantidas nas condições acima referidas secção 3.2, foram isolados 11 juvenis, os quais foram mantidos, conforme descrito na referida secção, até produzirem a quinta ninhada, tendo-se registado o dia e o número de juvenis produzidos por ninhada (Gráfico 1). Através do bioensaio realizado com a substância de referência foram encontrados valores para a concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) de 1,020 mg L<sup>-1</sup> com intervalo

de confiança a 95% (95%IC: 0,779-1,340) e um  $r^2$  de 0,974. A concentração letal mediana encontra-se portanto entre os valores de referência (ISO 6341,1996), ou seja, 0,6 e 2,1 mg L<sup>-1</sup>, através do gráfico 1 consegue-se ainda constatar que o número médio de juvenis sobe a partir da segunda ninhada e que o erro-padrão aumenta a partir da terceira ninhada, por isso, são utilizados os juvenis da terceira ninhada em que é das ninhadas com mais juvenis e também a ninhada onde a variabilidade é menor.

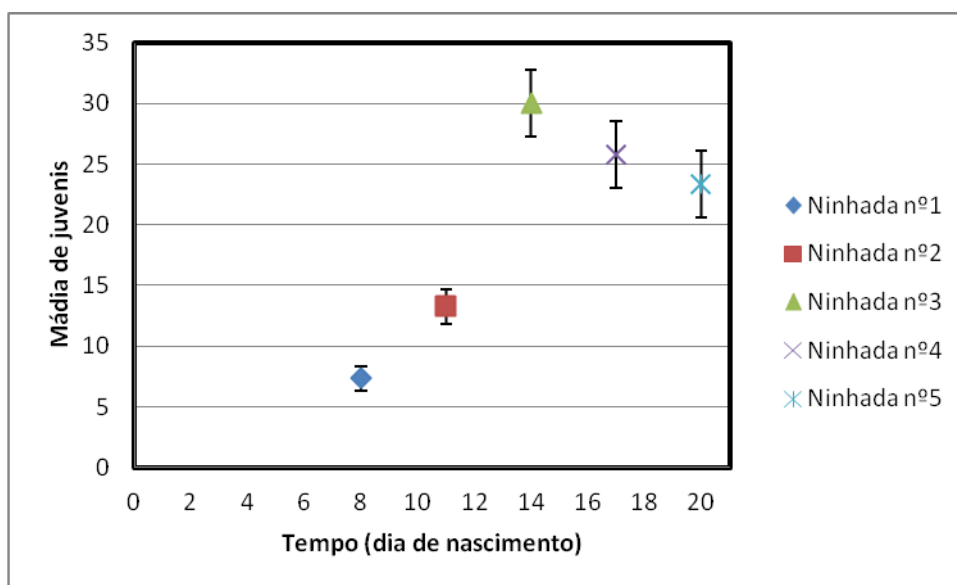


Gráfico 1. Média de juvenis de uma cultura de *Daphnia magna* por ninhada

#### 4.2. Espectros de absorção, curvas de calibração e degradação do hipoclorito de sódio

Os espectros das soluções efetuadas para a curva de calibração estão representados na Figura 14 (a1 e a2) Figura 15 (b1 e b2). Na Figura 14 encontra-se uma amostra de água u.p com hipoclorito de sódio, a1 com a concentração de 1400 mg L<sup>-1</sup> e a2 com a concentração de 5,45 mg L<sup>-1</sup>. Na Figura 15 encontra-se uma amostra de ASTM com hipoclorito de sódio, b1 com a concentração de 1400 mg L<sup>-1</sup> e b2 com a concentração de 5,45 mg L<sup>-1</sup>. Os espectros das restantes soluções são apresentadas no anexo IX (Figura X). Conforme se pode observar nas figuras, o espectro de absorção mostra o pico de absorvência aos 292nm, caraterístico do hipoclorito de sódio (March e Simonet, 2007). Em água u.p e ASTM podemos observar diferenças, ou seja, em água u.p. o hipoclorito de sódio tem uma absorvência menor que em ASTM, isto é a intensidade com que o composto é absorvido em água u.p. é menor que em ASTM, podendo-se ainda verificar que a

partir da concentração nominal de  $5,47 \text{ mg L}^{-1}$  inclusive em água u.p já não é possível o composto ser absorvido ao contrário do que é observado com ASTM.

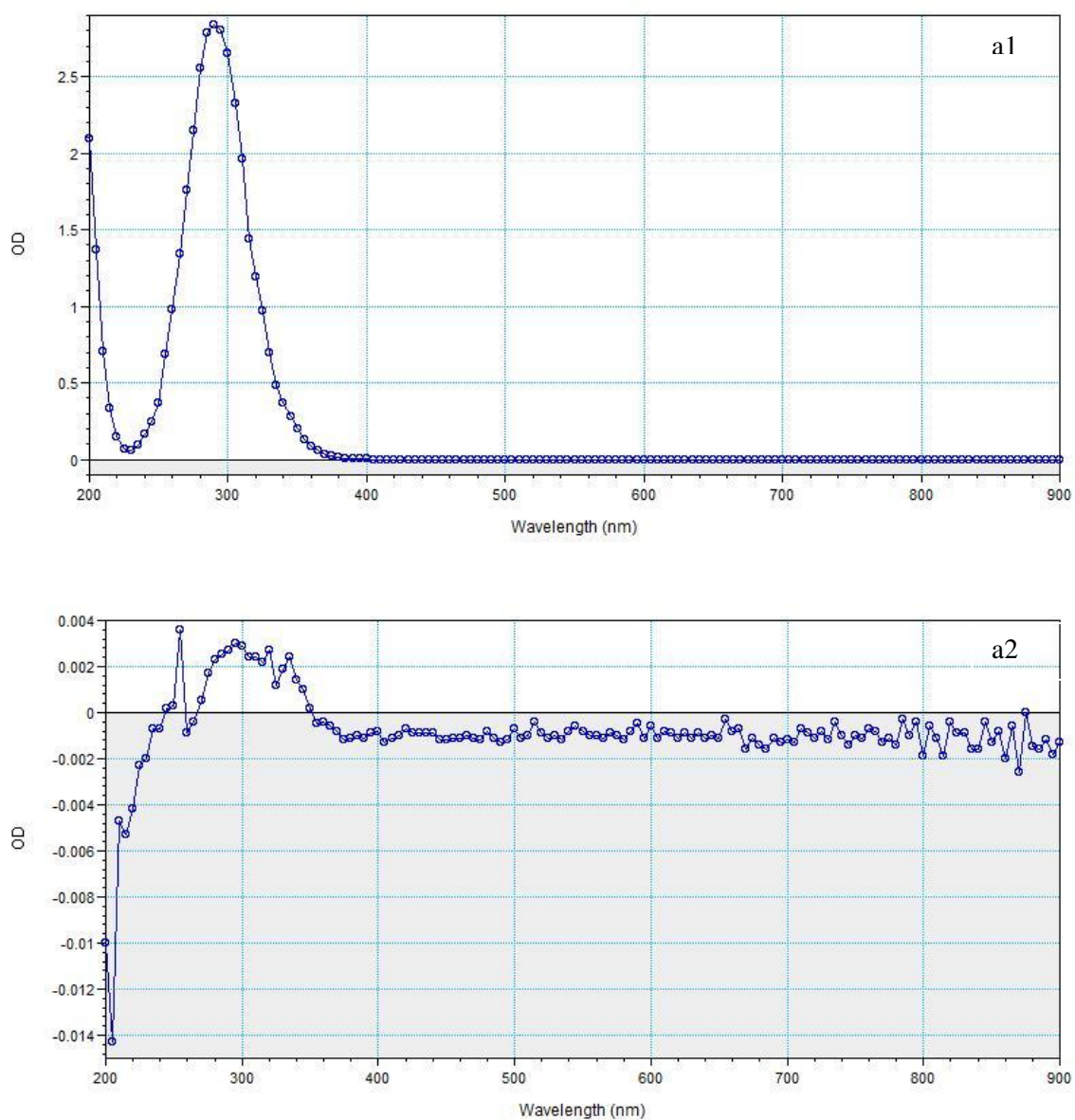


Figura 14. Espectros de absorção (de 200 a 900 nm) de uma solução de lixívia comercial diluída em água u.p. com uma concentração de  $1400 \text{ mg L}^{-1}$  (a1) e com uma concentração de  $5,47 \text{ mg L}^{-1}$  (a2)

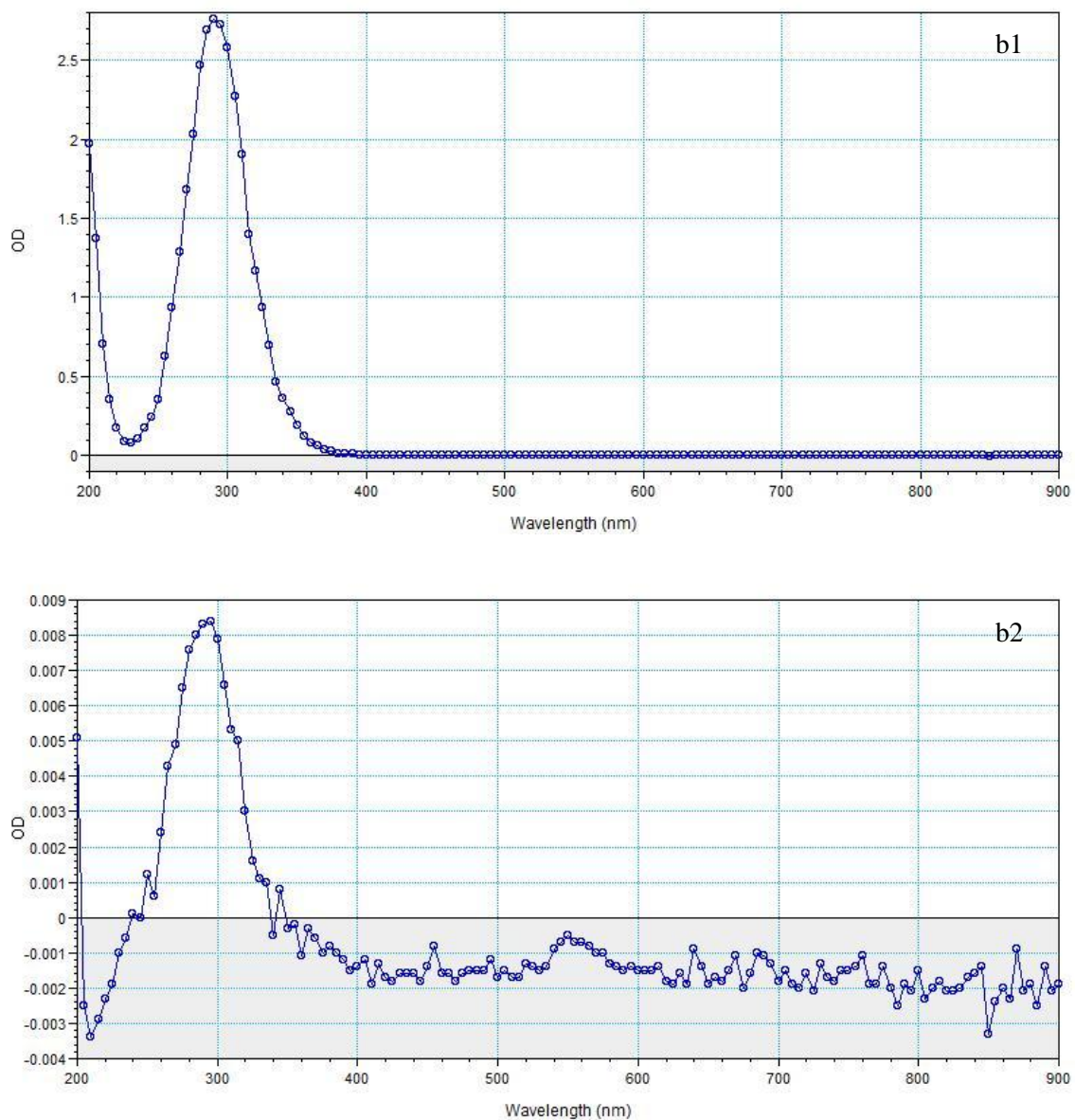


Figura 15. Espectros de absorção (de 200 a 900 nm) de uma solução de lixívia comercial diluída em ASTM com uma concentração de 1400 mg L<sup>-1</sup> (b1) e com uma concentração de 5,47 mg L<sup>-1</sup> (b2)

A relação é linear na gama de concentrações entre 1400 mg L<sup>-1</sup> e 5,47 mg L<sup>-1</sup> e foi possível ajustar um modelo de regressão linear, sendo que em ASTM obteve-se a reta  $Y=504,11X + (-5,5691)$  com um  $r^2$  de 0,999 (Figura 16) e uma correlação positiva de 1,000 e em água ultra-pura obteve-se a reta  $Y=486,99X + (-5,6945)$  com um  $r^2$  de 0,999 (Figura 17) e uma correlação positiva de 0,999. As absorvências a 292 nm das soluções contendo as concentrações nominais de 1400; 700; 350; 175; 87,5; 43,75; 21,89; 10,94 e 5,47 mg L<sup>-1</sup> em água ultra pura e ASTM estão apresentadas na Tabela 3 e Tabela 4, respetivamente.

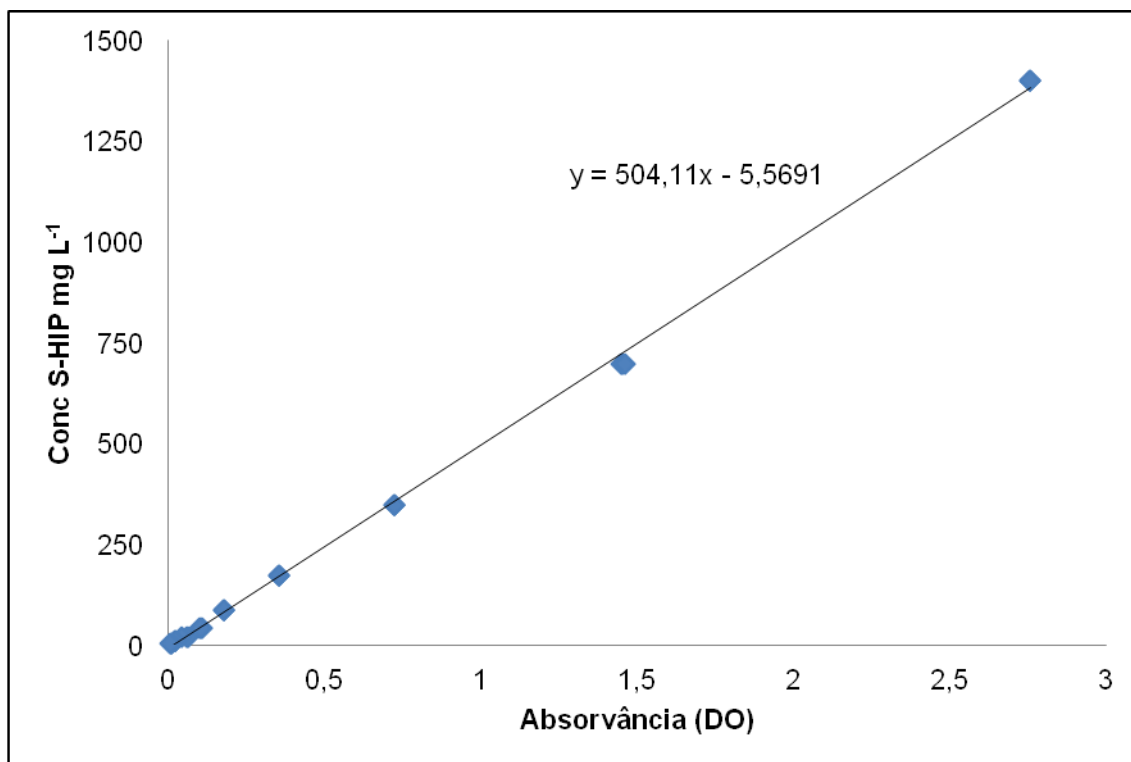


Figura 16. Reta de calibração do S-HIP em ASTM

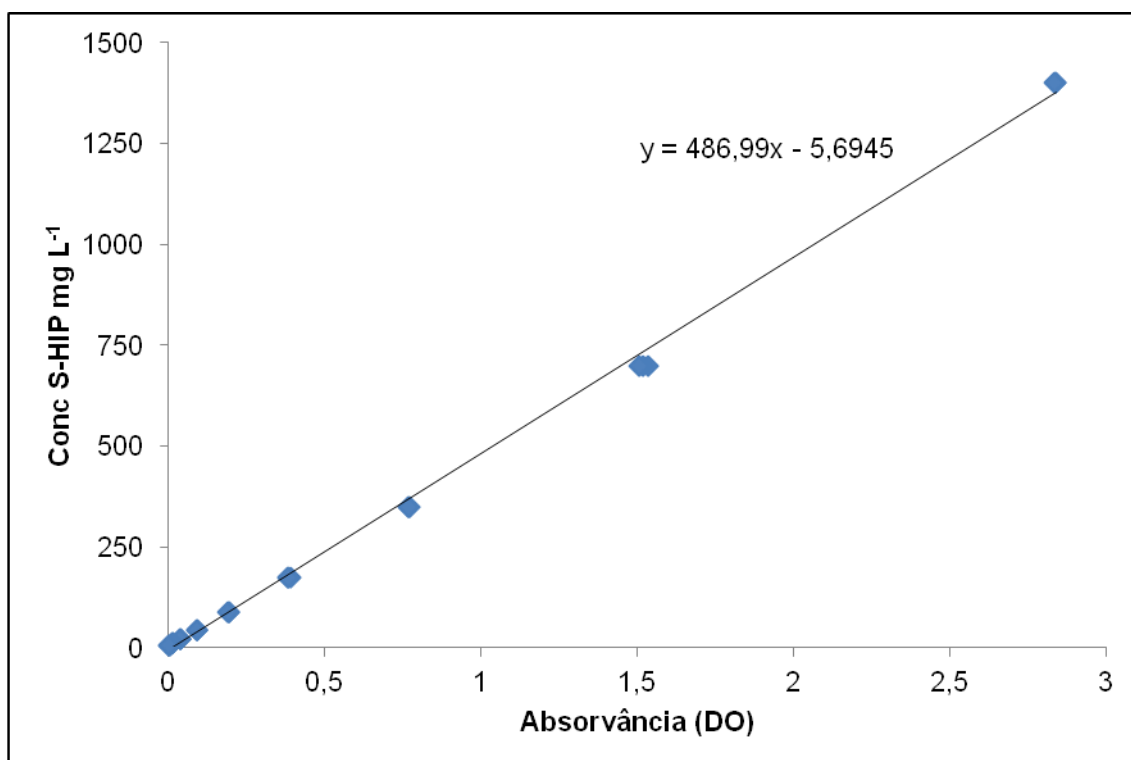


Figura 17. Reta de calibração do S-HIP em água ultra pura



Tabela 3. Concentrações nominais de hipoclorito de sódio em água u.p e correspondentes absorvências medidas a 292nm. Os valores são a absorvência a 292 nm de cada uma de três réplicas (soluções preparadas de forma independente), e os correspondentes valores da média e erro padrão da média (EPM)

Concentração de hipoclorito de sódio (mg L <sup>-1</sup> )	Réplica	Absorvência a 292 nm
1400	1	2,84
	2	2,84
	3	2,84
	Média	2,84
	E.P.M	0,002
700	1	1,53
	2	1,52
	3	1,50
	Média	1,52
	E.P.M	0,015
350	1	0,77
	2	0,77
	3	0,77
	Média	0,77
	E.P.M	0,002
175	1	0,39
	2	0,38
	3	0,38
	Média	0,39
	E.P.M	0,005
87,5	1	0,19
	2	0,19
	3	0,19
	Média	0,19
	E.P.M	0,002
43,75	1	0,09
	2	0,09
	3	0,09
	Média	0,09
	E.P.M	0,001

21,89	1	0,04
	2	0,04
	3	0,04
	Média	0,04
	E.P.M	0,000
10,94	1	0,01
	2	0,01
	3	0,01
	Média	0,01
	E.P.M	0,001
5,47	1	0,00
	2	0,00
	3	0,00
	Média	0,00
	E.P.M	0,002

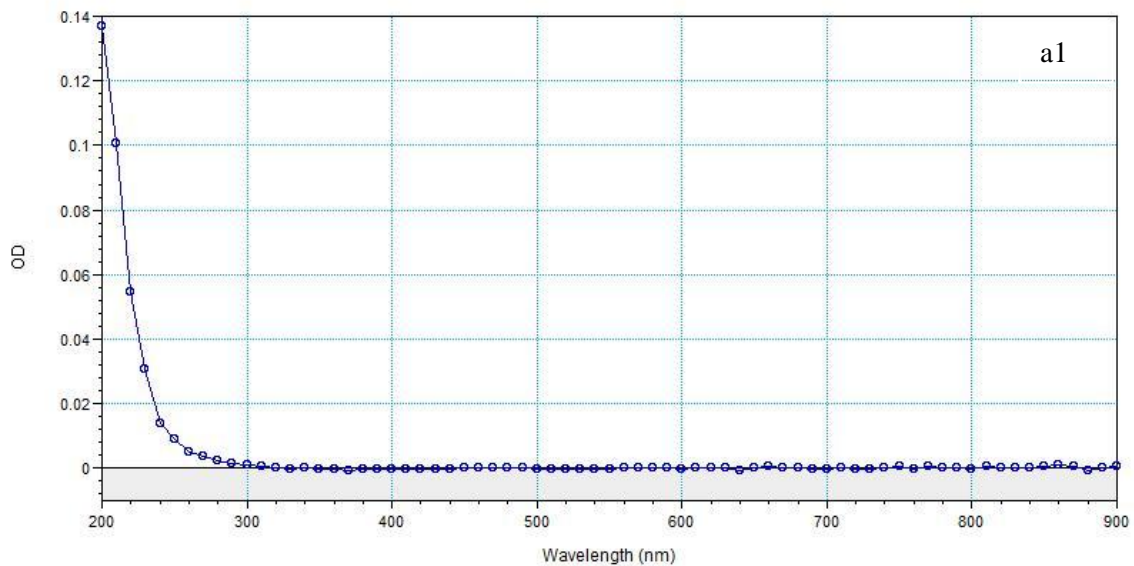
Tabela 4. Concentrações nominais de hipoclorito de sódio em ASTM e correspondentes absorvências medidas a 292nm. Os valores são a absorvência a 292 nm de cada uma de três réplicas (soluções preparadas de forma independente), e os correspondentes valores da média e erro padrão da média (EPM)

Concentração de hipoclorito de sódio (mg L <sup>-1</sup> )	Réplica	Absorvência a 292 nm
1400	1	2,76
	2	2,76
	3	2,76
	Média	2,76
	E.P.M	0,001
700	1	1,45
	2	1,45
	3	1,46
	Média	1,45
	E.P.M	0,006
350	1	0,72
	2	0,72
	3	0,72
	Média	0,72

	E.P.M	0,001
175	1	0,35
	2	0,35
	3	0,35
	Média	0,35
	E.P.M	0,001
87,5	1	0,18
	2	0,18
	3	0,18
	Média	0,18
	E.P.M	0,001
43,75	1	0,010
	2	0,011
	3	0,010
	Média	0,010
	E.P.M	0,005
21,89	1	0,06
	2	0,06
	3	0,04
	Média	0,05
	E.P.M	0,011
10,94	1	0,02
	2	0,02
	3	0,02
	Média	0,02
	E.P.M	0,001
5,47	1	0,01
	2	0,01
	3	0,01
	Média	0,01
	E.P.M	0,001

#### 4.3. Espectros de absorção, curvas de calibração e degradação do bromonitroetanol por degradação do bronopol

O espectro de absorção da amostra da solução inicial de bronopol (concentração de 4 mg L<sup>-1</sup>) de duas das 6 soluções preparadas, uma em água u.p. e outra em ASTM são apresentados na Figura 18. Conforme se pode ver na Figura 18a1, o espectro de absorção mostra o pico de absorvência aos 244 nm em água u.p. e na figura 18a2 em ASTM, pico de absorvência característico do bronopol (Sanyal *et al*, 1996). As absorvências a 244nm das soluções contendo a concentração nominal de 4 mg L<sup>-1</sup> em água u.p e em ASTM estão apresentadas na Tabela 5 e Tabela 6, respetivamente.



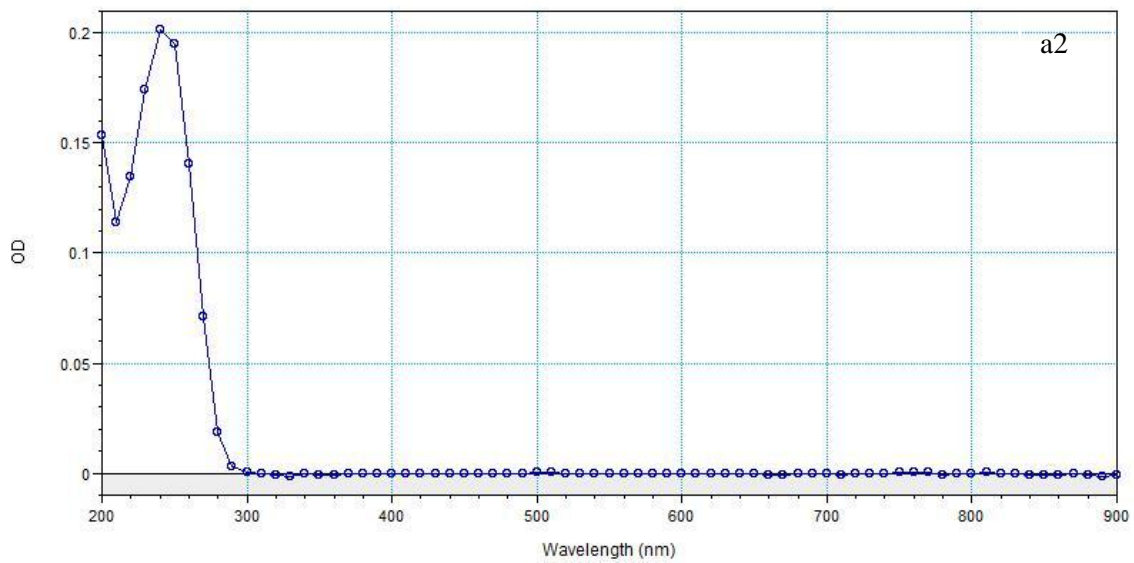


Figura 18. Espectros de absorção (de 200 a 900 nm) do bronopol em água u.p com uma concentração de 4 mg L<sup>-1</sup> (a1) e em ASTM com uma concentração de 4 mg L<sup>-1</sup> (a2)

Tabela 5. Concentração nominal de 4 mg L<sup>-1</sup> em água u.p correspondentes às absorvências medidas a 244nm. Os valores são a absorvência a 244 nm de cada uma de três réplicas (soluções preparadas de forma independente), e os correspondentes valores da média e erro padrão da média (EPM) às 96 horas

Concentração de bronopol (mg L <sup>-1</sup> )	Réplica	Absorvência a 244 nm
4	1	0,01
	2	0,02
	3	0,01
	Média	0,01
	E.P.M	0,002

Tabela 6. Concentração nominal de 4 mg L<sup>-1</sup> em ASTM correspondentes às absorvências medidas a 244nm. Os valores são a absorvência a 244 nm de cada uma de três réplicas (soluções preparadas de forma independente), e os correspondentes valores da média e erro padrão da média (EPM) às 96 horas

Concentração de bronopol (mg L <sup>-1</sup> )	Réplica	Absorvência a 244 nm
4	1	0,20
	2	0,20
	3	0,20
	Média	0,20
	E.P.M	0,002

A relação é linear na gama de concentrações entre 32 e 0,25 mg L<sup>-1</sup> com uma diluição de 1:2 (v/v). Foram feitas 3 réplicas de cada concentração quer em ASTM quer em água u.p. Em ASTM obteve-se a reta  $Y=347,62X + (-1,4748)$  com um  $r^2$  de 0,943 e uma correlação positiva de 0,971 (Figura 19) e em água u.p obteve-se a reta  $Y=570,11 + (-0,7254)$  com um  $r^2$  de 0,993 e uma correlação positiva de 0,996 (Figura 20), sendo possível ajustar um modelo de regressão linear.

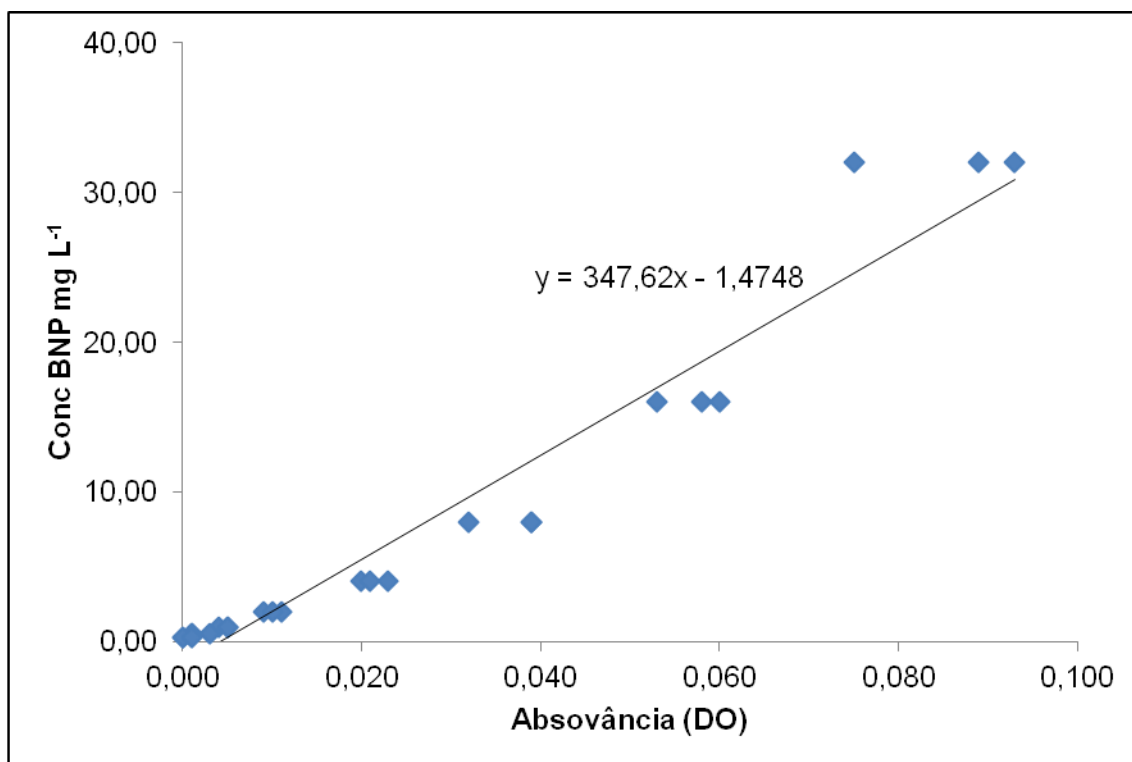


Figura 19. Reta de calibração do BNP em ASTM

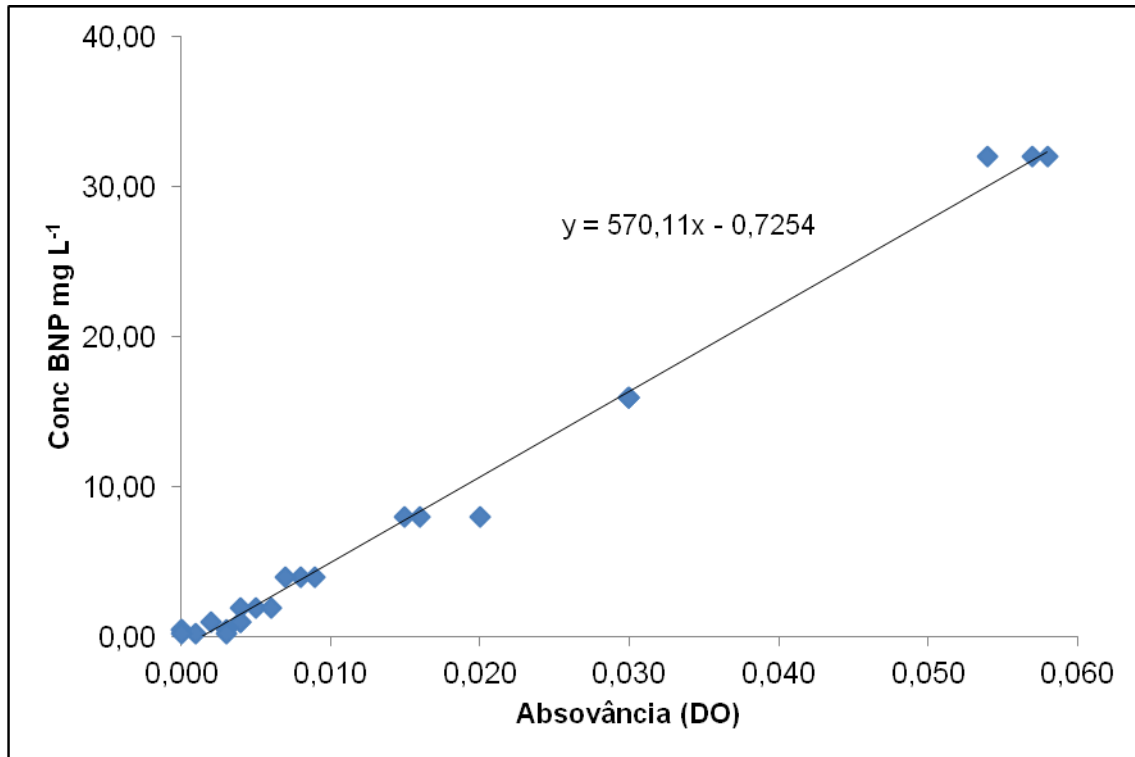


Figura 20. Reta de calibração do BNP em água ultra pura

Antes de iniciar os ensaios agudos e crónicos foi realizado um teste de degradação de 96 horas do composto bronopol em ASTM e em água ultra-pura (Anexo VII) de forma a obter uma comparação. A água ultra pura é usada como comparação visto ser uma água sem quaisquer compostos que interfiram com o composto a ser testado. Em ASTM existe uma degradação ao longo do tempo do bronopol, sendo que até às 6 horas a degradação é rápida e contínua, a partir das 12 horas a degradação é mais lenta (Tabela 7), sendo que há diferenças estatisticamente significativas das 3, 6, 9, 12, 24, 48 e 96 horas face às 0 horas ( $p < 0,05$ ) e em água ultra-pura o composto mantém-se, ocorrendo pequeníssimas oscilações havendo diferenças estatisticamente significativas das 6, 9, 12, 24 e 96 horas face às 0 horas ( $p < 0,05$ ). Durante a degradação do bronopol ocorrendo a formação do composto bromonitroetanol, o seu aparecimento ao longo do espectro (Gráfico 2) é caracterizado pelo seu comprimento de onda que se situa nos 244nm (Sanyal *et al*, 1996).

Tabela 7. Formação (F%) de bromonitroetanol através da degradação de bronopol às 3,6,9,12,24, 48 e 96h com a concentração de 4mg L<sup>-1</sup> através do método de espectrofotometria. A média (3 réplicas) representa o pico máximo do BNE obtido a 244nm, em Densidade ótica (DO). DP indica o desvio-padrão da média e (\*) indica as médias que são estatisticamente diferentes das 0 horas

	0h	3h	6h	9h	12h	24h	48h	96h
U.P								
DO	0,0193	0,0140	0,0140	0,0133	0,0170	0,0137	0,0193	0,0137
	0,0183	0,0167	0,0127	0,0127	0,0130	0,0140	0,0177	0,0167
	0,0190	0,0170	0,0150	0,0133	0,0130	0,0167	0,0177	0,0140

Média	0,0189	0,0159	0,0139*	0,0131*	0,0143*	0,0148*	0,0182	0,0148*
DP	0,0005	0,0016	0,0012	0,0004	0,0023	0,0016	0,0010	0,0016
% F		84,12	73,53	69,41	75,88	78,24	96,47	78,24
ASTM								
DO	0,0483	0,1133	0,1467	0,1617	0,1680	0,1847	0,1867	0,2020
	0,0477	0,1143	0,1480	0,1617	0,1677	0,1860	0,1863	0,2037
	0,0533	0,1133	0,1577	0,1600	0,1657	0,1830	0,1867	0,2007
Média	0,0498	0,1137*	0,1508*	0,1611*	0,1671*	0,1846*	0,1866*	0,2021*
DP	0,0031	0,0006	0,0060	0,0010	0,0013	0,0015	0,0002	0,0015
% F		228,35	302,90	323,66	335,71	370,76	374,78	406,03

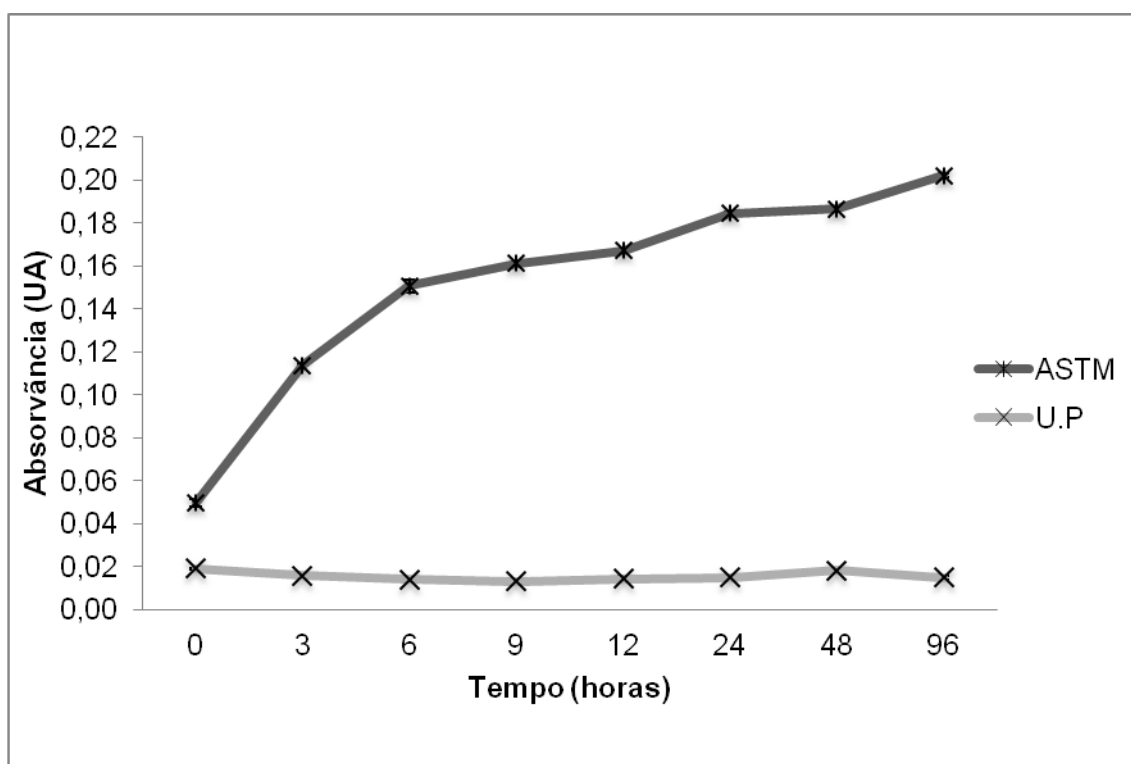


Gráfico 2. Formação de bromonitroetanol em água ultra pura e ASTM através da degradação de bronopol, em função da absorvência com uma concentração de  $4\text{mg L}^{-1}$  durante 96 horas

#### 4.4. Ensaio agudo com solução comercial de hipoclorito de sódio

Durante o ensaio agudo da solução comercial de hipoclorito de sódio foram medidos os parâmetros da água de tratamento, oxigénio dissolvido (OD), pH e condutividade que permitem validar os testes (Anexo VI, Tabela 15). Para os testes poderem ser validados o oxigénio dissolvido deve ser superior ou igual a  $3\text{ mg L}^{-1}$ , o pH deve-se situar entre os valores 6 e 9 e a condutividade deve-se situar entre  $140$  e  $250\text{ mg L}^{-1}$ . Segundo a OCDE (2004) em ensaios de *Daphnia magna* é



permitida uma mortalidade de 10% no controlo. Atendendo a todos os parâmetros o ensaio foi validado.

O hipoclorito é um composto instável e que facilmente se decompõe em cloro e oxigénio (March e Simonet, 2007) e em concentrações abaixo de 5,47 mg L<sup>-1</sup> não é possível quantificar por espectrofotometria, por isso o método não deve ser usado em ensaios de toxicidade onde sejam testadas concentrações abaixo do limite de detecção. Quanto ao valor da concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>), às 24 horas foi de 0,093 mg L<sup>-1</sup> de hipoclorito estando entre os valores de 0,076 e 0,16 mg L<sup>-1</sup> (USEPA, 1984), às 48 horas foi de 0,062 mg L<sup>-1</sup> e às 96 horas foi de 0,051 mg L<sup>-1</sup>. Não foi possível prosseguir para o ensaio crónico, pois verificou-se que o método de espectrofotometria aplicado não seria o mais indicado tendo em conta a gama de concentrações usadas (0,01-0,17 mg L<sup>-1</sup>), não foi possível usar uma gama de concentrações mais elevada, pois *Daphnia magna* é muito sensível a esta gama de concentrações ocorrendo uma mortalidade de 100%. Segundo a Diretiva-EU 93/67/EEC os valores de CL<sub>50</sub> encontrados enquadram-se nos compostos muito tóxicos para os organismos aquáticos pois são inferiores a 1 mg L<sup>-1</sup> e de acordo com a CE 1272/2008 são valores prejudiciais para o ambiente, pois são inferiores a 10 mg L<sup>-1</sup>.

Durante o ensaio agudo às 24 horas registou-se uma mortalidade de aproximadamente 25, 70 e 100% nas concentrações de 0,08; 0,11 e 0,17 mg L<sup>-1</sup>, respetivamente; às 48 horas na concentração 0,03 mg L<sup>-1</sup> obteve-se uma mortalidade de 5%, na concentração 0,08 mg L<sup>-1</sup> obteve-se 95% e nas concentrações 0,11 e 0,17 mg L<sup>-1</sup> obteve-se uma mortalidade de 100%, e por último às 96 horas atingiu-se uma mortalidade de 5% nas concentrações de 0,02 e 0,03 mg L<sup>-1</sup>, 25% na concentração de 0,05 mg L<sup>-1</sup> e 100% nas concentrações de 0,11 e 0,17 mg L<sup>-1</sup> (Gráfico 3). Os valores da concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) obtidos às 24, 48 e 96h são de 0,093; 0,062 e 0,051 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 8).

Tabela 8. Valores da concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) de hipoclorito para *Daphnia magna* determinados com base na mortalidade registada às 24, 48, 72 e 96h, com os correspondentes intervalos de confiança a 95% (IC95%)

	CL <sub>50</sub> (24h)	CL <sub>50</sub> (48h)	CL <sub>50</sub> (72h)	CL <sub>50</sub> (96h)
	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>
	(IC95%)	(IC95%)	(IC95%)	(IC95%)
S-HIP	0,093	0,062	0,057	0,051
	(0,083-0,104)	(-)	(-)	(0,029-0,097)

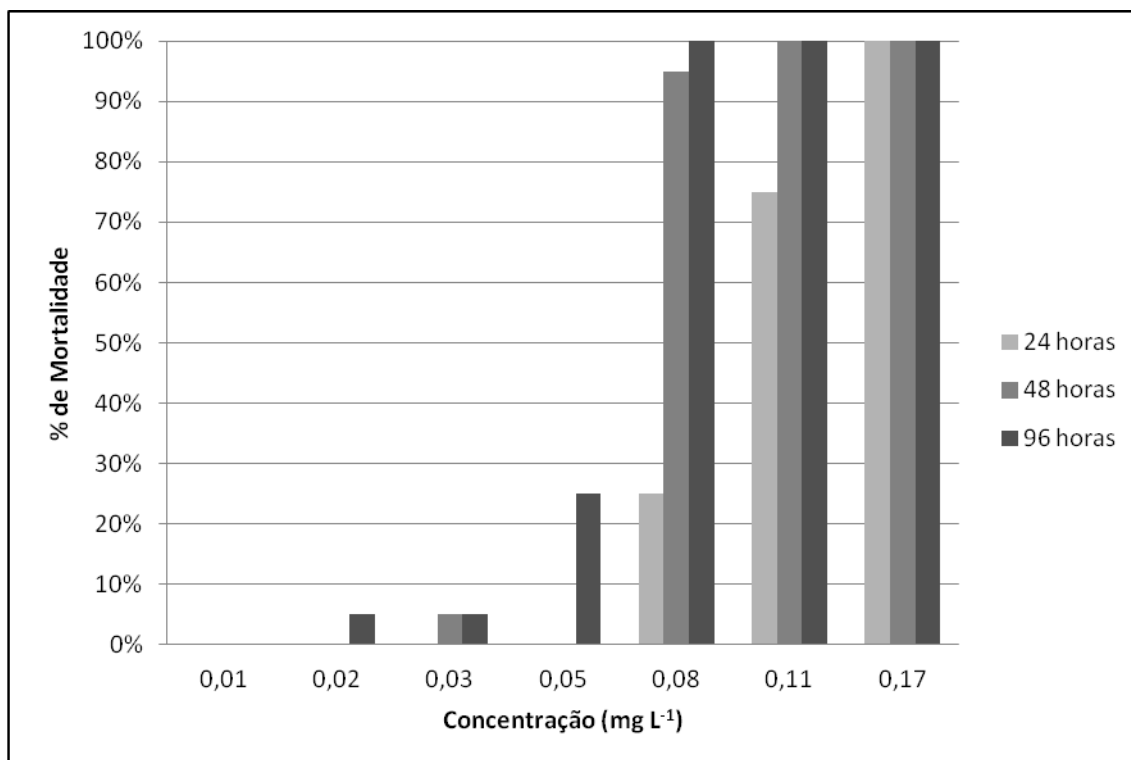


Gráfico 3. Mortalidade (%) de *Daphnia magna* face à exposição de hipoclorito de Sódio durante 96 horas

#### 4.5. Ensaio agudo com bronopol

Durante o ensaio agudo de bronopol foram medidos os parâmetros da água de tratamento, oxigénio dissolvido (OD), pH e condutividade que permitem validar os testes (Anexo VII, Tabela 16). Para os testes poderem ser validados o oxigénio dissolvido deve ser igual ou superior a 3 mg L<sup>-1</sup>, o pH deve-se situar entre 6 e 9 valores e a condutividade deve-se situar entre 140 e 250 µg L<sup>-1</sup>. Segundo a OCDE (2004) em ensaios de *Daphnia magna* é permitida uma mortalidade de 10% no controlo. Atendendo a todos os parâmetros o ensaio foi validado.

As concentrações usadas ao longo do ensaio foram: 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 mg L<sup>-1</sup>. Ao longo do ensaio, verificou-se que apenas na concentração de 4 mg L<sup>-1</sup> houve uma mortalidade de 100% às 48 horas, a partir de 1 mg L<sup>-1</sup> inclusive ocorreu uma mortalidade de 100% às 72 horas e às 96 horas uma mortalidade de 100% a partir de 0,5 mg L<sup>-1</sup> inclusive (Gráfico 4).

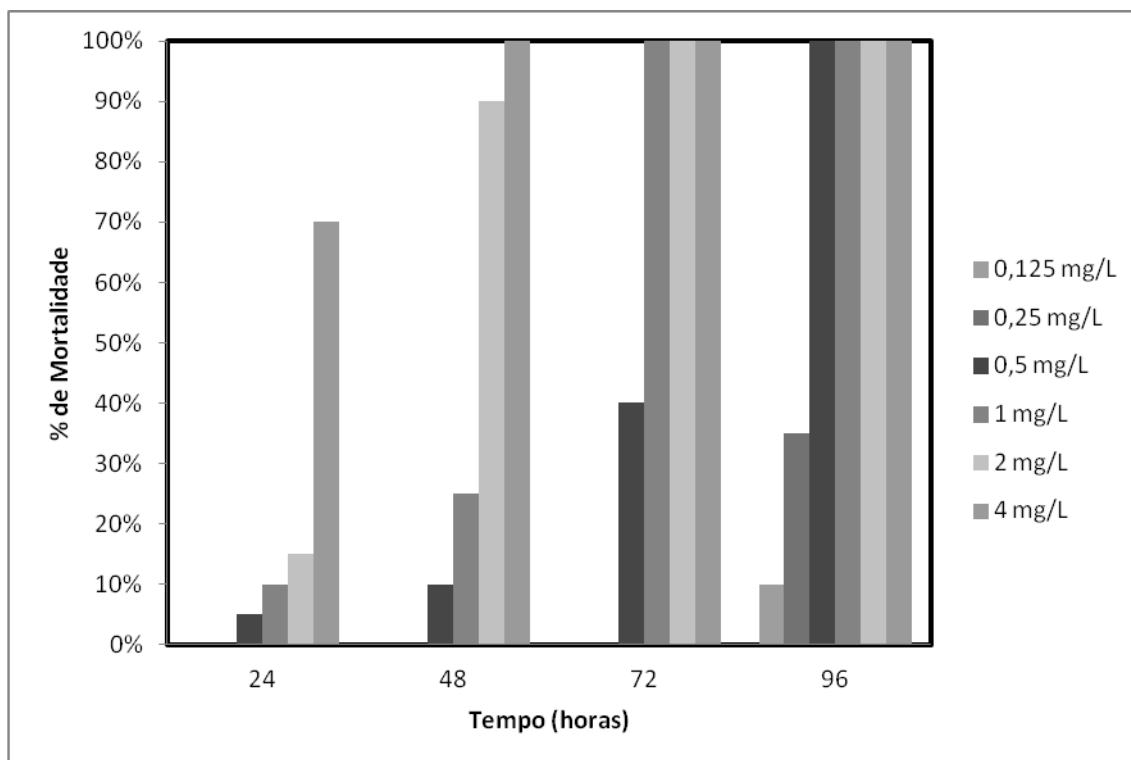


Gráfico 4. Mortalidade (%) de *Daphnia magna* exposta ao bromonitroetanol por degradação do bronopol durante 96 horas

Na leitura das absorvências das diferentes concentrações constatou-se que há uma degradação do bronopol a partir do momento em que se inicia o ensaio (Tabela 9), havendo formação do composto bromonitroetanol, entre os produtos de degradação é um dos compostos produzido em maior quantidade e dos mais persistentes no ambiente (Cui *et al*, 2011). A degradação pode ser verificada através do comprimento de onda, ou seja, o bronopol é caracterizado pela sua absorvência no comprimento de onda de 210 nm (Wang, Provan e Helliwell, 2002), enquanto que o bromonitroetanol é caracterizado pela absorvência no comprimento de onda de 244 nm (Sanyal *et al*, 1996), observando-se nitidamente que há uma formação rápida até as 24 horas sendo que às 24 horas é o pico de formação do bromonitroetanol, e logo de seguida começa a ocorrer uma degradação lenta do mesmo (Gráfico 5). Os valores da concentração letal mediana ( $CL_{50}$ ) encontrados às 24, 48, 72 e 96 horas estão representados na Tabela 10.

Tabela 9. Formação (F%) de bromonitoetanol através da degradação de bronopol às 24, 48 e 96h com as concentrações de 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 mg L<sup>-1</sup> através do método de espectrofotometria. A média (3 réplicas) representa o pico máximo de BNE obtido a 244nm, em Densidade ótica (DO). DP indica o desvio-padrão da média e (\*) indica diferenças estatisticamente diferentes do controle (p<0,05)

	Ctrl	0,125 mg L <sup>-1</sup>	0,25 mg L <sup>-1</sup>	0,5 mg L <sup>-1</sup>	1 mg L <sup>-1</sup>	2 mg L <sup>-1</sup>	4 mg L <sup>-1</sup>
0 H							
Média (DO)	0,000	0,005	0,004	0,010	0,013	0,033	0,064
DP	0,000	0,004	0,001	0,006	0,002	0,002	0,003
% F	-	-	-	-	-	-	-
24 H							
Média (DO)	0,000	0,006	0,011	0,019*	0,047*	0,071*	0,139*
DP	0,000	0,003	0,004	0,001	0,005	0,004	0,003
% F	-	25,000	214,286	87,500	264,706	115,909	117,647
48H							
Média (DO)	0,000	0,005*	0,010	0,016	0,034	0,069*	0,137*
DP	0,000	0,005	0,003	0,001	0,002	0,003	0,003
% F	-	0,000	171,429	55,000	164,706	109,091	114,510
72 H							
Média (DO)	0,000	0,002*	0,005	0,015	0,033*	0,072*	0,140*
DP	0,000	0,003	0,001	0,002	0,002	0,003	0,004
% F	-	-	50,000	45,000	156,863	117,424	119,216
96 H							
Média (DO)	0,000	-0,002	0,000	-0,001	0,033	0,053*	0,132*
DP	0,000	0,002	0,001	0,002	0,021	0,021	0,001
% F	-	-	-	-	160,784	61,364	106,667

Tabela 10. Parâmetros de toxicidade durante 96h face à exposição do bronopol (BNP) em *Daphnia magna*

	CL <sub>50</sub> (24h) mg L <sup>-1</sup> (IC95%)	CL <sub>50</sub> (48h) mg L <sup>-1</sup> (IC95%)	CL <sub>50</sub> (72h) mg L <sup>-1</sup> (IC95%)	CL <sub>50</sub> (96h) mg L <sup>-1</sup> (IC95%)
BNP	3,184 (2,335-5,417)	1,165 (0,953-1,438)	0,528 (-)	0,252 (0,209-0,307)

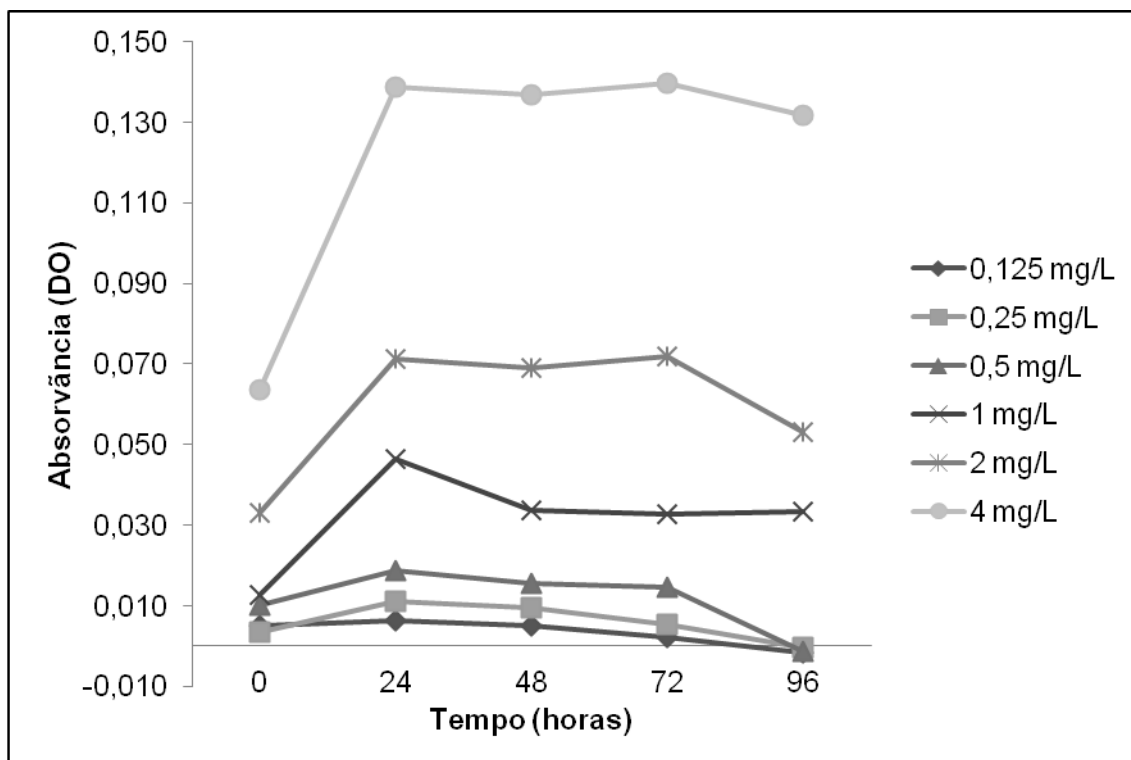


Gráfico 5. Formação de bromonitroetanol através da degradação de bronopol, em função da absorvância a 244nm durante 96 horas

## 4.6.Ensaio crónico com bronopol

Durante o ensaio agudo de bronopol foram medidos os parâmetros da água de tratamento, oxigénio dissolvido (OD), pH e condutividade que permitem validar os testes (Anexo VIII, Tabela 17, 18,19 e 20).Para os testes poderem ser validados o oxigénio dissolvido deve ser igual ou superior a 3 mg L<sup>-1</sup>, o pH deve-se situar entre 6 e 9 valores e a condutividade deve-se situar entre 140 e 250 mg L<sup>-1</sup>. Segundo a OCDE (2004) em ensaios de *Daphnia magna* é permitida uma mortalidade de 20% no controlo. Atendendo a todos os parâmetros o ensaio foi validado. O bronopol durante o ensaio crónico é degradado passado 24 horas havendo formação do bromonitroetanol (produto de degradação) no comprimento de onda de 244 nm, sempre que há uma

mudança de meio a absorvência diminui e depois volta a subir ligeiramente, mantendo-se, mostrando que o composto não desaparece, permanecendo ao longo do ensaio apesar de não se conseguir quantificar a quantidade de composto.

O ensaio crónico teve a durabilidade de 21 dias com uma exposição contínua ao bronopol e sem haver trocas de oxigénio. O teste foi validado, sendo que a mortalidade das fêmeas adultas não excederam os 20% no controlo e nas restantes concentrações e a média de descendentes vivos no controlo foi superior a 60 juvenis vivos (OCDE, 2012). As concentrações utilizadas foram 5: 0; 0,04; 0,08; 0,016; 0,032. Ao longo do ensaio obteve-se juvenis vivos e ovos abortados, havendo ausência de juvenis mortos (Gráfico 6). Através da análise de variância (ANOVA) houve diferenças significativas tanto no juvenis vivos ( $P < 0,05$ ) como nos ovos abortados ( $P < 0,05$ ). O CENO dos juvenis vivos foi de  $0,004 \text{ mg L}^{-1}$  que é a concentração mais baixa, não se registando valores para o CEO. O CENO dos ovos abortados foi de  $0,004 \text{ mg L}^{-1}$ , não se registando também valores para o CEO.

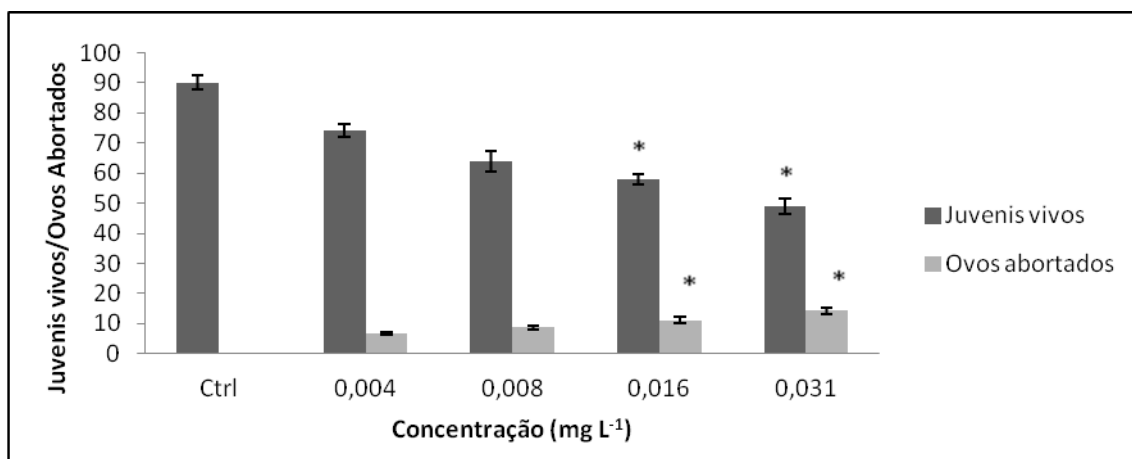


Gráfico 6. Número de juvenis vivos e número de ovos abortados de *Daphnia magna* durante 21 dias com as correspondentes barras do erro padrão da média. (\*) indica diferenças estatisticamente diferentes ( $p < 0,005$ , Dunnett's test) relativamente ao controlo

As amostras retiradas ao longo do ensaio demonstram uma formação do bromonitroetanol (Tabela 11) e também demonstraram que das 0 às 24 horas houve uma pequena diminuição da concentração do bromonitroetanol, exceto na concentração mais alta em que se constatou uma subida bastante acentuada. Após a troca do meio que se sucede a cada 48 horas há uma nova descida da quantidade de composto mantendo-se até às primeiras 48 horas (Gráfico 7).

Tabela 11. Formação (F%) de bromonitroetanol (BNE) às 24, 48, 72 e 96h através do método de espectrofotometria em ASTM. A média (4 réplicas) representa o pico máximo do BNE obtido a 244nm, em Densidade ótica (DO). DP indica o desvio-padrão da média e (\*)indica diferenças estatisticamente diferentes do controlo (p<0,05)

	Ctrl	0,004 mg L <sup>-1</sup>	0,008 mg L <sup>-1</sup>	0,016 mg L <sup>-1</sup>	0,032 mg L <sup>-1</sup>
0 H					
Média (DO)	0,041	0,088	0,094	0,099	0,105
SD	0,023	0,011	0,012	0,009	0,017
% F	-	-	-	-	-
24 H					
Média (DO)	0,068	0,076	0,080*	0,082*	0,087*
SD	0,008	0,008	0,007	0,004	0,007
% F	-	13,477	15,695	17,304	17,759
48 H (meio antigo)					
Média (DO)	0,071	0,151	0,076	0,079	0,082
SD	0,005	0,243	0,004	0,003	0,005
% F	-	-	19,406	20,221	21,937
48 H (meio novo)					
Média (DO)	0,081	0,077	0,077	0,074	0,074
SD	0,008	0,007	0,008	0,003	0,005
% F	-	-	-	-	-
96 H (meio antigo)					
Média (DO)	0,047	0,042	0,057	0,062	0,060
SD	0,024	0,026	0,033	0,020	0,025
% F	-	45,455	25,974	16,216	18,919

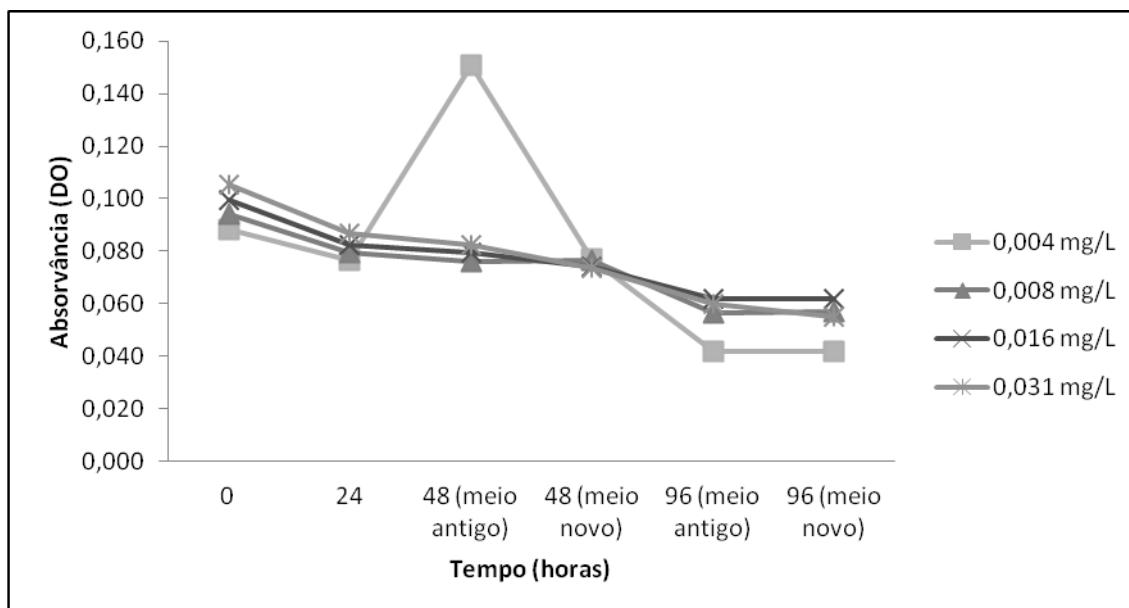


Gráfico 7. Formação de Bromonitroetanol através da degradação de Bronopol, em função da absorvência durante 21 dias

Em concentrações abaixo das  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  não foi possível quantificar adequadamente o composto por espectrofotometria. Quanto à degradação, em água ultra pura não se constatou diferenças relativamente ao ASTM enquanto que em ASTM pôde observar-se nitidamente a formação do bromonitroetanol, esta diferença pode ser explicada talvez devido à presença dos micro e macronutrientes pelo qual o ASTM é caracterizado. No final do ensaio crónico foi encontrado o valor de CENO de  $0,004 \text{ mg L}^{-1}$  para os juvenis vivos afastando-se dos valores encontrados pela USEPA ( $0,066 \text{ mg L}^{-1}$ ), ou seja, ao longo do ensaio valores superiores a  $0,004 \text{ mg L}^{-1}$  provocaram efeitos sub-letais em *Daphnia magna*, verificou-se ainda que à medida que a concentração aumenta vão diminuindo a produção de juvenis vivos aumentando por sua vez a produção de ovos abortados, apoiando o fato de que o composto a longo prazo afeta a reprodução de *Daphnia magna*. Segundo a Diretiva-EU 93/67/EEC os valores de  $CL_{50}$  encontrados enquadram-se nos compostos tóxicos para os organismos aquáticos pois situam-se entre  $1-10 \text{ mg L}^{-1}$  e de acordo com a CE 1272/2008 são valores prejudiciais para o ambiente, pois são inferiores a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .

## 5. Conclusões e futuros estudos

Segundo a Diretiva-EU 93/67/EEC os valores de  $CL_{50}$  encontrados ao longo de todos os ensaios enquadram-se nos compostos tóxicos para os organismos aquáticos pois situam-se entre 1-



10 mg L<sup>-1</sup> e de acordo com a CE 1272/2008 são valores prejudiciais para o ambiente, pois são inferiores a 10 mg L<sup>-1</sup>.

O hipoclorito de sódio e o bronopol têm efeitos letais e sub-letais em *Daphnia magna*. No ensaio agudo com o hipoclorito de sódio e o bronopol verifica-se que os compostos são tóxicos mesmo em concentrações baixas, na ordem das 0,08 e 0,5 mg L<sup>-1</sup> respetivamente. A nível reprodutivo o bronopol leva a uma diminuição na produção de juvenis e aumento na produção de ovos abortados mesmo na concentração mais baixa na ordem dos 0,004 mg L<sup>-1</sup>. As concentrações testadas em ambos os compostos são concentrações mais altas que as permitidas no ambiente segundo a legislação, contudo devem ser tomadas em conta, pois no ambiente os organismos não estão apenas expostos ao hipoclorito de sódio e bronopol mas também a outros compostos, podendo ocorrer efeitos sinérgicos em que as misturas de todos os compostos presentes no ambiente potencia a toxicidade. No entanto, seria necessário mais tempo para investigar se surtiria efeitos a nível populacional, e por conseguinte, a nível do ecossistema.

Num próximo estudo seria necessário realizar estudos populacionais de forma a dar continuidade ao presente estudo, seria também importante efetuar misturas com os dois compostos, tendo em conta que ambos estão presentes nos ecossistemas, introduzir o fator de temperatura tendo em conta as diferenças climáticas atuais, e principalmente estudar métodos mais eficazes quanto à quantificação dos compostos.

## 6. Referências bibliográficas

1. American Society for Testing and Materials (ASTM). 1980. Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. Report, p. E790-80.
2. Arbaciauskas, K. 1998. Life-history traits of ephippial and parthenogenetically derived daphnids: indicators of different life-history strategies. *Archiv für Hydrobiologie* 52: 339-358.
3. Baird, D. J., Soares, A.M.V.M., Girling, A., Barber, I., Bradley, M.C., Calow, P. 1989. The long-term maintenance of *Daphnia magna* for use in ecotoxicity tests: Problems and prospects. In: Lokke, H., Tyle, H., Bro Rasmussen (Eds). *Proceedings of the First European Conference on Ecotoxicology*, 17-19 October 1988, Lyngby, Denmark, p. 144-148.
4. Carvalho, G.R., Hughes, R.N. 1983. The effect of food availability, female culture-density and photoperiod on ephippia production in *Daphnia magna* Straus (Crustacea: Cladocera). *Freshwater Biology* 13: 37-46.
5. Center for Clean Products and Clean Technologies (CCPCT). 2000. Green seal standard and environmental evaluation for general-purpose, bathroom, and glass cleaners used for industrial and institutional purposes. CCPCT, University of Tennessee, Knoxville, TN.
6. Commission of the European Communities. 1996. Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and commission regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances. Part II; Environmental Risk Assessment. Office for official publications of the European Communities, Luxembourg.
7. Cui, N., Zhang, X., Xie, Q. *et al.* 2011. Toxicity profile of labile preservative Bronopol in water: the role of more persistent and toxic transformations products. *Environmental Pollution* 159: 609-615.
8. Delupis, D., Rotondo, V. 1988. Phototaxis in aquatic invertebrates: possible use in ecotoxicity tests. *Ecotoxicology Environment Safety* 16: 189-193.
9. Dettmers, J.M., Stein, R.A., 1992. Food consumption by larval gizzard shad: zooplankton effects and implications for reservoir communities. *Trans. Am. Fish. Soc* 121: 494-507.
10. Dodson, S., Frey, D. 1991. The cladocera and other Branchiopoda. In Thorpe, J.H e A.P. Covich (eds), *Ecology and Systematics of North American Freshwater Invertebrates*. Academic Press, San Diego.

11. Dodson, S.I., Merritt, C.M., Shannahan, J.P. and Schults, C.M. 1999. Low doses of atrazine increases male production in *Daphnia pulicaria*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 1568.
12. Dye, C., Schlabach, M., Green, J., Remberger, M., Kaj, L., Palm-Cousins, A., Brorström-Lundén, E. 2007. Bronopol; Chemical properties, fate and toxicity. In: Bronopol, Resorcinol, m-Cresol and Triclosan in the Nordic Environment. Nordic Council of Ministers, Denmark, 13-16pp. Available online at: <http://www.norden.org/en/publications/publications/2007-585>.
13. Emmanuel, E., Keck, G., Blanchard, J.M., Vermande, P., Perrodin, Y. 2004. Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. *Environment International* 30: 891–900.
14. Environmental Protection Agency of United States (USEPA). 1984. Ambient Water Quality Criteria for Chlorine. EPA 440/5-84-030.
15. Environment Protection Conservation and Protection Environment Canada (EPS). 1990. Biological test method: Acute lethality test using *Daphnia spp.* Canadian cataloguing in publication data. Report EPS 1/RM/I 1. Environment Canada Ottawa (Ontario) K1A 0H3.
16. Environmental Protection Agency of United States (USEPA). 2012. Attachment H Total Residual Chlorine Discharge Limit Calculation NPDES Permit No. MA0103284 Boston, MA.
17. Gasser, L., Fenner, K., Scheringer, M., 2007. Indicators for the exposure assessment of transformation products of organic micropollutants. *Environmental Science Technology* 41: 2445-2451.
18. Guilhermino, L. 1996. Modelos e sistemas de avaliação da toxicidade de substâncias químicas. Tese de Doutoramento. Universidade de Coimbra. 197 pp.
19. Hazard Substance Data Bank (HSDB). 2004. US National Library of medicine. Available on: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~1ldfSA:1>
20. Hazard Substance Data Bank (HSDB). 2010. US National Library of medicine. Available on: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~OlrMD:1>
21. Hobaek, A., Larsson, P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. *Ecology* 71: 2255–2268.
22. Holtze, M.S., Sorensen, S.R., Sorensen, J., Aamand, J. 2008. Microbial degradation of the benzonitrile herbicides dichlobenil, bromoxynil and ioxynil in soil and subsurface environments e insights into degradation pathways, persistent metabolites and involved degrader organisms. *Environmental Pollution* 154: 155-168.
23. Huntington, TG. 2006. Evidence for intensification of the global water cycle: review and synthesis. *Journal of Hydrology* 319: 83–95.

24. International Standards Organization (ISO). 1982. Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). ISO 6341 E. Geneve, Switzerland.
25. Li, M.H. 2008. Effects of nonionic surfactants on survival, oxidative stress, and cholinesterase activity of planarian. *Chemosphere* 70: 1796-1803.
26. Manning, T., Wilson, S., Chapman, J. 1996. Toxicity of Chlorine and Other Chlorinated Compounds to Some Australian Aquatic Organisms. *Bull. Environmental Contamination Toxicology* 56: 971-976.
27. March, J.G., Simonet, B.M. 2007. A green method for the determination of hypochlorite in bleaching products based on its native absorbance. *Science Direct, Talanta* 73: 323-236.
28. Margerum, W., Schurter, M., Hobson, J., Moore, E. 1994. Water chlorination chemistry: non metal redox kinetics of chloramines and nitrite ion. *Environmental Science Technology* 28 (2): 331-337.
29. Matczuk, M., Obarski, N., Mojski, M. 2012. The impact of the various chemical and physical factors on the degradation rate of Bronopol. *International Journal of Cosmetic Science* 34: 451–457.
30. Mattei, D., Cataudella, S., Mancini, L., Tancioni, L., Migliore, L. 2006. Tiber river quality in the stretch of a sewage treatment plant: effects of river water or disinfectants to *Daphnia* and structure of benthic macroinvertebrates community. *Water, Air, and Soil Pollution* 177: 441–455
31. Michels, E., De Meester, L. 1998. The influence of food quality on the phototactic behaviour of *Daphnia magna* Straus. *Hydrobiology* 379: 199–206.
32. Michels, E., Semsari, S., Bin, C., De Meester, L. 2000. Effect of sublethal doses of cadmium on the phototactic behavior of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology Environment Safety* 47: 261–265.
33. Moore, MN. 1982. Lysosomes and environmental stress. *Mar Pollution Bull* 13: 42-3.
34. Moore, MN. 1990. Lysosomal reaction to environmental stress and pollution. In: Chambers PL, Chambers CM, editors. *Estuarine ecotoxicology*. JAPAGA: 81-7.
35. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2012. *Daphnia* sp. Acute immobilization test and reproduction test. OECD Guidelines for Testing of Chemicals: vol. 211.
36. Organization For Economic Co-Ooperation And Development (OECD). 2004. Revised Proposal for updating Guidelines 202. *Daphnia* sp. Acute Immobilisation.
37. Panouillères, M., Boillot, C., Perrodin, Y. 2007. Study of the combined effects of a peracetic acid-based disinfectant and surfactants contained in hospital effluents on *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 16: 327-340.

38. Lopez, A., Mascolo, G.C., Tiravanti, G. 2001. Formation of volatile halogenated byproducts during chlorination of isoproturon aqueous solutions. *Chemosphere* 45:pp. 269–74.
39. Rand, M., Petrocelli, R. 1983. Resting eggs in rotifers. *Hidrobiologia* 104: 213-224.
40. Remberger, M., Woldegiorgis, A., Kaj, L., Andersson, J., Cousins, A., Dusan, B., Ekheden, Y., Brorstrom-Lundén, E. Results from the Swedish screening 2005. 2006. Subreport 2. Biocides. Swedish Environmental Research Institute
41. Richardson, ML., Bowron, JM. 1985. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *Journal of Pharmacology* 37: 1– 12.
42. Rodriguez-Mozaz, S., López de Alda, M.J., Barceló, D. 2006. Fast and simultaneous monitoring of organic pollutants in a drinking water treatment plant by a multianalyte biosensor followed by LC–MS validation. *Talanta* 69: 377–384.
43. Ruppert, E.E., Fox, R.S, Barnes, R.D. 2004. *Invertebrate Zoology – A functional Evolutionary Approach*. 7<sup>th</sup> ed. Brooks Cole Thomson, Belmont CA. 963pp.
44. Salinoja-Salonen, MS., Jokela, JK. 1991. Measurement of organic halogen compounds in urine as an indicator of exposure. *Scand J Workplace. Environment Health* 17: 75-8.
45. Sanyal, A.K; Basu, M; Banerjee, A. 1996. Rapid ultraviolet spectrophotometric determination of Bronopol: application to raw material analysis and kinetic studies of Bronopol degradation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 14: 1447-1453.
46. Shan-Shin , T., Shih-Hsien, C., Ling-Yin, H., Meng-Hsuan, W., Kai-Sung, W. 2012. Evaluation of acute toxicity and teratogenic effects of disinfectants by *Daphnia magna* embryo assay. *Environmental Pollution* 168: 54-61.
47. Stein, J.R. 1973. *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge. University Press, London, UK, pp. 7-24.
48. Svendsen, C., Spurgeon, DJ., Hankard, PK., Weeks, JM. 2004. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? *Ecotoxicology Environment Safety* 57: 20-9.
49. Szal, GM., Nolan, PM., Kennedy, LE., Barr, CP., Bilger, MD. 1991. The toxicity of chlorinated wastewater: in stream and laboratory case studies. *Res J Water Pollution Cont Fed* 63: 910-920.
50. Tabor, F., Barber, B. 1996. Fate of linear alkylbenzene sulfonate in the Mississippi River. *Environment Science of Technology* 30: 161–71.
51. Tatarazako, N., Oda, S., Watanabe, H., Morita, M., Iguchi, T. 2003. Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male *Daphnia*. *Chemosphere* 53: 827–833.
52. Taylor, PA. 1993. An evaluation of the toxicity of the various forms of chlorine to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology Chemical* 12: 925-930.

53. Tezel, U., Pavlostathis, S.G. 2009. Transformation of benzalkonium chloride under nitrate reducing conditions. *Environment Science Technology* 43 (5): 1342-1348.
54. Tezel, U. 2009. Fate and effect of quaternary ammonium compounds in biological systems. Georgia Institute of Technology.
55. UN Educ. Sci. Cult. Organ. (UNESCO). 2009. *The United Nations World Water Development Report 3: Water in a Changing World*. Paris/New York: UNESCO/Berghahn Books
1. Wang, H; Provan, J.G; Helliwell, K. 2002. Determination of Bronopol and its degradation products by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29: 387-392.
2. United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. Bronopol: reregistration eligibility decision (RED). Washington, D.C., 20460. Available online at: [www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/2770red.pdf](http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/2770red.pdf).
3. United States Environmental Protection Agency (USEPA). 2005. 2-Bromo-2-Nitro-1,3- -Propanediol (Bronopol) Exemptions from the requirement of a tolerance. Available online at: <http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2005/November/Day-09/p22255.htm>

ANEXOS

# Anexo I

Tabela 12. Composição química, em termos qualitativos e quantitativos do meio ASTM para as culturas de *Daphnia magna* (Guilhermino, 1996)

Agente químico	Quantidade na solução de reserva (g)	Volume final da solução de reserva (mL)	Volume (mL) a colocar em 20L de água ultra-pura
NaHCO <sub>3</sub>	19,2	1000	200
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	24,57	1000	200
Kcl	0,8	1000	200
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,4		

As três primeiras soluções foram preparadas em água ultra-pura com antecedência e armazenadas a 4°C; a última solução foi sempre preparada no momento

# Anexo II

## Suplemento orgânico de *Ascophylum nodosum*

O suplemento orgânico para posteriormente ser acrescentado ao meio de *D.magna* foi preparado de forma a obter uma diluição de 1/10; para tal, diluiu-se uma solução concentrada de *Ascophylum nodosum* em água ultra-pura de modo a obter uma absorvência de 0,620, a um comprimento de onda de 400 nm. A solução depois de preparada foi armazenada no escuro a 4°C.

# Anexo III

Tabela 13. Composição química, em termos qualitativos e quantitativos dos micronutrientes e macronutrientes do meio MBL para a cultura de *Chlorella vulgaris* (Stein, 1973)

Agentes químicos	Quantidade por litro (g L <sup>-1</sup> )	Quantidade por litro de meio (mL L <sup>-1</sup> )	Quantidade de substância (g) para 250 mL
<b>Macronutrientes</b>			
CaCl2.H2O	36,76	1 mL L <sup>-1</sup>	9,1900
MgSO4.7H2O	36,97	1 mL L <sup>-1</sup>	9,2425
NaHCO3	12,60	1 mL L <sup>-1</sup>	3,1500
K2HHPO4	8,71	1 mL L <sup>-1</sup>	2,1775
NaNO3	85,01	1 mL L <sup>-1</sup>	21,2525
NaSiO3.9H2O	28,42	1 mL L <sup>-1</sup>	7,1050
<b>Micronutrientes</b>			



Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	4,36	1 mL L <sup>-1</sup>	1,0875
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,15	1 mL L <sup>-1</sup>	0,7875
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,01	1 mL L <sup>-1</sup>	0,0025
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,022	1 mL L <sup>-1</sup>	0,0055
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01	1 mL L <sup>-1</sup>	0,0025
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,18	1 mL L <sup>-1</sup>	0,0450
Nna <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,006	1 mL L <sup>-1</sup>	0,0015
<b>Vitaminas</b>			
Thiamina HCL (B1)	0,1 mg L <sup>-1</sup>	1 mL por cada 8 L	_____
Biotina (H)	0,5 µg L <sup>-1</sup>	1 mL por cada 8 L	_____
Cianocobalamina (B12)	0,5 µg L <sup>-1</sup>	1 mL por cada 8 L	_____
<b>Tampão</b>			
Tris (hidroximetil)- aminometano	50 g/200ml	2 mL L <sup>-1</sup>	Ajustar pH a 7,2 com HCL concentrado

## Anexo IV

### Preparação do complexo vitamínico

O complexo vitamínico é acrescentado no meio ASTM (20L), nos matrizes de 5L e nos recipientes de vidro de 10L em quantidades mínimas de 2 mL, 0,5 mL e de 1 mL, respetivamente.

Para a preparação deste complexo vitamínico são necessárias três vitaminas: a vitamina B1 (tiamina HCl, 20 mg L<sup>-1</sup>), a vitamina H (biotina, 10 mg L<sup>-1</sup>) e a vitamina B12 (cianocobalina, 10 mg L<sup>-1</sup>), de seguida são retirados 2500 µL, 25 µL e 25 µL, respetivamente, para um volume final de 500 mL de água ultra-pura. A solução é depois filtrada a vácuo através de um filtro de 0,2 µm (Spritzen/Syringe-Filter) e dividida em microtúbulos de 2 mL que são depois armazenados a -20°C.

## Anexo V

Tabela 14. Média e correspondente desvio-padrão (E.P.M) da temperatura (°C), pH, oxigénio dissolvido (mg L<sup>-1</sup>) e condutividade (S.cm<sup>-1</sup>) do ensaio agudo a 20°C face à exposição do dicromato de potássio a *Daphnia magna* durante 24 horas

Temperatura		pH		Oxigénio dissolvido		Condutividade	
Média	E.P.M	Média	E.P.M	Média	E.P.M	Média	E.P.M

0 horas	20,01	0,09	7,55	0,23	6,85	0,11	578,00	2,84
24 horas	18,84	0,36	7,54	0,26	7,02	0,18	580,86	3,19

## Anexo VI

Tabela 15. Média e correspondente desvio-padrão (E.P.M) da temperatura (°C), pH, oxigénio dissolvido (mg L<sup>-1</sup>) e condutividade (S.cm<sup>-1</sup>) do ensaio agudo a 20°C face á exposição do hipoclorito de sódio a *Daphnia magna* durante 96 horas

	Temperatura		pH		Oxigénio dissolvido		Condutividade	
	Média	E.P.M	Média	E.P.M	Média	E.P.M	Média	E.P.M
0 horas	18,65	0,15	7,85	0,21	5,50	0,06	571,50	2,75
24 horas	18,62	0,20	7,89	0,18	5,38	0,06	575,75	4,98
48 horas	18,63	0,16	7,81	0,15	5,43	0,09	584,41	10,14
72 horas	18,63	0,16	7,78	0,14	5,48	0,12	599,28	17,69
96 horas	18,64	0,16	7,30	0,32	5,42	0,12	602,69	15,85

## Anexo VII

Tabela 16. Média e correspondente desvio-padrão (E.P.M) da temperatura (°C), pH, oxigénio dissolvido (mg L<sup>-1</sup>) e condutividade (S.cm<sup>-1</sup>) do ensaio agudo a 20°C face á exposição do bronopol a *Daphnia magna* durante 96 horas

	Temperatura		pH		Oxigénio dissolvido		Condutividade	
	Média	E.P.M	Média	E.P.M	Média	E.P.M	Média	E.P.M
0 horas	18,65	0,16	6,28	0,21	8,93	0,64	555,29	3,14
24 horas	18,61	0,21	7,80	0,37	10,11	0,28	555,46	2,03
48 horas	18,62	0,17	7,74	0,20	9,76	0,37	560,96	4,71
72 horas	18,62	0,17	7,74	0,16	9,50	0,52	561,79	1,57
96 horas	18,63	0,17	7,36	0,29	9,37	0,52	567,32	3,59

## Anexo VIII

Tabela 17. Média e correspondente desvio-padrão (E.P.M) do oxigénio dissolvido (mg L<sup>-1</sup>) do ensaio crónico a 20°C face á exposição do bronopol a *Daphnia magna* durante 21 dias

do brônquio a <i>Daphnia magna</i> durante 21 dias									
[mg L <sup>-1</sup> ]	Meio	0		Primeira semana		Segunda semana		Terceira semana	
		Média	E.P.M	Média	E.P.M	Média	E.P.M	Média	E.P.M
0	Novo	9,34	0,10	9,21	0,50	9,30	0,60	9,35	0,42

	Antigo	-	-	9,11	0,52	9,23	0,61	9,21	0,39
0,004	Novo	9,23	0,26	9,22	0,50	9,33	0,40	9,43	0,33
	Antigo	-	-	9,15	0,31	9,27	0,19	9,23	0,39
0,008	Novo	9,54	0,17	9,25	0,50	9,29	0,37	9,32	0,39
	Antigo	-	-	9,17	0,38	9,21	0,41	9,22	0,26
0,016	Novo	9,33	0,19	9,23	0,29	9,27	0,28	9,28	0,19
	Antigo	-	-	9,13	0,27	9,19	0,19	9,21	0,26
0,031	Novo	9,22	0,15	9,20	0,33	9,33	0,31	9,27	0,42
	Antigo	-	-	9,09	0,22	9,21	0,61	9,21	0,26
0,063	Novo	9,34	0,21	9,27	0,46	9,35	0,22	9,30	0,19
	Antigo	-	-	9,21	0,31	9,28	0,19	9,25	0,39
0,125	Novo	9,23	0,20	9,25	0,42	9,31	0,51	9,23	0,42
	Antigo	-	-	9,18	0,36	9,27	0,49	9,20	0,39

Tabela 18. Média e correspondente desvio-padrão (E.P.M) do pH do ensaio crónico a 20°C face á exposição do bronopol a *Daphnia magna* durante 21 dias

[mg L <sup>-1</sup> ]	Meio	0		Primeira semana		Segunda semana		Terceira semana	
		Média	E.P.M	Média	E.P.M	Média	E.P.M	Média	E.P.M
0	Novo	8,2	0,02	8,19	0,02	8,18	0,04	8,21	0,05
	Antigo	-	-	8,20	0,03	8,17	0,03	8,19	0,02
0,004	Novo	8,2	0,03	8,21	0,04	8,18	0,04	8,21	0,05
	Antigo	-	-	8,20	0,03	8,19	0,02	8,17	0,03
0,008	Novo	8,2	0,01	8,19	0,02	8,18	0,04	8,21	0,04
	Antigo	-	-	8,22	0,05	8,21	0,04	8,17	0,03
0,016	Novo	8,2	0,03	8,19	0,02	8,19	0,05	8,22	0,05
	Antigo	-	-	8,20	0,03	8,19	0,02	8,17	0,06
0,031	Novo	8,2	0,02	8,19	0,02	8,20	0,04	8,22	0,03
	Antigo	-	-	8,16	0,03	8,17	0,03	8,19	0,02
0,063	Novo	8,2	0,03	8,17	0,04	8,18	0,04	8,21	0,05
	Antigo	-	-	8,21	0,05	8,21	0,02	8,17	0,04
0,125	Novo	8,2	0,03	8,19	0,04	8,20	0,05	8,21	0,04
	Antigo	-	-	8,20	0,05	8,19	0,03	8,18	0,03

Tabela 19. Média e correspondente desvio-padrão (E.P.M) da temperatura (°C) do ensaio crónico a 20°C face á exposição do bronopol a *Daphnia magna* durante 21 dias

[mg L <sup>-1</sup> ]	Meio	0		Primeira semana		Segunda semana		Terceira semana	
		Média	E.P.M	Média	E.P.M	Média	E.P.M	Média	E.P.M
0	Novo	20,4	0,05	20,2	0,19	20,3	0,17	20,1	0,09
	Antigo	-	-	20,2	0,09	20,3	0,10	20,1	0,11
0,004	Novo	20,4	0,05	20,2	0,18	20,3	0,18	20,1	0,09
	Antigo	-	-	20,2	0,06	20,3	0,11	20,1	0,11
0,008	Novo	20,4	0,05	20,2	0,10	20,2	0,12	20,1	0,09
	Antigo	-	-	20,2	0,05	20,2	0,10	20,1	0,09
0,016	Novo	20,3	0,04	20,2	0,05	20,3	0,08	20,1	0,09
	Antigo	-	-	20,2	0,16	20,3	0,10	20,1	0,09
0,031	Novo	20,4	0,05	20,2	0,19	20,3	0,09	20,1	0,09
	Antigo	-	-	20,2	0,09	20,3	0,05	20,1	0,10
0,063	Novo	20,4	0,03	20,2	0,19	20,3	0,13	20,1	0,09
	Antigo	-	-	20,2	0,11	20,3	0,10	20,1	0,11
0,125	Novo	20,4	0,05	20,2	0,16	20,3	0,14	20,1	0,09
	Antigo	-	-	20,2	0,13	20,3	0,09	20,1	0,07

Tabela 20. Média e correspondente desvio-padrão (E.P.M) da condutividade (µs.cm<sup>-1</sup>) do ensaio crónico a 20°C face á exposição do bronopol a *Daphnia magna* durante 21 dias

[mg L <sup>-1</sup> ]	Meio	0		Primeira semana		Segunda semana		Terceira semana	
		Média	E.P.M	Média	E.P.M	Média	E.P.M	Média	E.P.M
0	Novo	618	15,3	595	17,24	588	18,10	577	18,10
	Antigo	-	-	603	5,31	595	9,03	587	9,03
0,004	Novo	611	12,3	593	12,4	581	17,91	572	17,91
	Antigo	-	-	605	5,31	592	9,03	581	9,03
0,008	Novo	615	11,9	590	9,85	577	9,11	582	9,11
	Antigo	-	-	603	4,99	583	9,08	592	9,08
0,016	Novo	617	14,8	589	12,4	579	10,12	585	10,12
	Antigo	-	-	609	5,31	582	10,86	589	10,85
0,031	Novo	611	13,9	590	8,76	573	9,85	574	9,80
	Antigo	-	-	603	4,90	582	10,17	577	10,05

0,063	Novo	609	14,1	591	7,09	578	16,87	579	16,50
	Antigo	-	-	599	8,10	587	9,97	582	9,80
0,125	Novo	612	13,9	600	8,11	583	16,33	574	15,90
	Antigo	-	-	610	7,15	589	8,35	578	8,10